

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Marie-Thérèse CHAUVET, née LENCI

1^{re} THÈSE :

ISOLEMENT ET STRUCTURE D'UNE NOUVELLE
HORMONE PEPTIDIQUE : LA VASOTOCINE.
CHIMIE COMPARÉE DES HORMONES NEURO-
HYPOPHYSAIRES DES VERTÉBRÉS.

2^e THÈSE :

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le _____ devant la Commission d'examen

17 MAI 1963

MM. JOST

Président

LEDERER

ACHER

} *Examineurs*

I M P R I M E R I E

R. FOULON & C^{ie}

29, RUE DEPARCIEUX, 29

PARIS - 1964

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Marie-Thérèse CHAUVET, née LENCI

1^{re} THÈSE :

ISOLEMENT ET STRUCTURE D'UNE NOUVELLE
HORMONE PEPTIDIQUE : LA VASOTOCINE.
CHIMIE COMPARÉE DES HORMONES NEURO-
HYPOPHYSAIRES DES VERTÉBRÉS.

2^e THÈSE :

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le

devant la Commission d'examen

MM. JOST	<i>Président</i>
LEDERER	{ <i>Examineurs</i>
ACHER	

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen M. ZAMANSKY

PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure	THELLIER	T	Physique du Globe
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées	L'HÉRITIER	T	Biologie générale (Orsay)
GRASSÉ	T	Evolution des êtres organisés	GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay)
PRÉVOST	T	Chimie organique	PONCIN	T	Mécanique générale
WYART	T	Minéralogie et Cristallographie	DUBREIL	T	Arithmétique et Théorie des nombres
TEISSIER	T	Zoologie	QUELET	T	Chimie organique
MANGENOT	T	Biologie végétale (Orsay)	CAGNIARD	T	Géophysique appliquée
AUGER	T	Physique quantique et Relativité	CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire
MONNIER	T	Physiologie générale	CUVILLIER	T	Micropaléontologie
PIVETEAU	T	Paléontologie	JUNG	T	Pétrographie
ROCARD	T	Physique (E.N.S.)	TRILLAT	T	Microscopie et Diffraction électronique
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.)	WIEMANN	T	Chimie organ. et struct.
LAFFITTE	T	Chimie générale	JACQUINOT	T	Spectroscopie et Physique céleste (Orsay)
FAVARD	T	Géométrie supérieure	VASSY	T	Physique de l'atmosphère
COULOMB	T	Physique du Globe	DESTOUCHES	T	Théories physiques
Mlle COUSIN	T	Biologie anim. (S.P.C.N.)	AMIEL	T	Chimie générale
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale	HOCART	T	Minéral. et Cristallogr.
DRACH	T	Zoologie	J.-P. MATHIEU	T	Physique (Optique)
KASTLER	T	Physique (E.N.S.)	COUTEAUX	T	Biologie animale (P.C.B.)
EPHRISSI	T	Génétique	MAY	T	Zoologie (Orsay)
RIVIÈRE	T	Géologie S.P.C.N. et sédimentation.	CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie
GAUTHERET	T	Biologie végét. (P.C.B.)	FELDMANN	T	Biologie végétale marine
R. LUCAS	T	Recherches physiques	GUINIER	T	Phys. des Solides (Orsay)
A. THOMAS	T	Biologie cellulaire	JOST	T	Physiologie comparée
ARNULF	T	Optique appliquée	FORTET	T	Calcul des Probabilités et Physique mathématique
MORAND	T	Physique Enseignement	SCHWARTZ	T	Calcul différ. et Intégral
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.)	CHOUARD	T	Physiologie végétale
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides	MALAVARD	T	Aviation (Technique aéronautique)
DANJON	T	Astronomie	BRELOT	T	Calcul différ. et intégral
PETIT	T	Biologie maritime	NORMANT	T	Chimie organique
QUENEY	T	Météorologie et Dynamique atmosphérique	BÉNARD	T	Chimie minérale
GALLIEN	T	Embryologie	BUVAT	T	Botanique (E.N.S.)
EICHHORN	T	Botanique	DUGUÉ	T	Statistiques mathématiques
DE CUGNAC	T	Biologie végét. (S.P.C.N.)	SOULAIRAC	T	Psychophysiologie
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique	ULRICH	T	Physiologie végétale
			MARÉCHAL	T	Optique théorique et appliquée
			KIRRMANN	T	Théories chimiques
			CHADEFAUD	T	Botanique



GUINOCHET	T	Biol. végétale (S.P.C.N., Orsay)	Mlle LE BRETON	T	Physiologie de la nutrition
ROLLET	T	Chimie minérale	SALEM	T	Mathématiques générales
Mlle JOSIEN ...	T	Chimie (S.P.C.N.)	LELONG	T	Application de l'analyse à la géométrie
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes	DEVILLERS	T	Anatomie et Histologie comparées
ARNOULT	T	Electronique (Orsay)	EHRESMANN ...	T	Topologie algébrique
CHAPELLE	T	Physique (Orsay)	FRANÇON	T	Physique (S.P.C.N.)
DELANGE	T	Mathématiques I (Orsay)	GLANGEAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique
DENY	T	Mathématiques générales (Orsay)	GODEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.)
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides	PISOT	T	Technique Mathém. de la Physique
G. LUCAS	T	Géologie	ROCH	T	Géologie
ALLARD	T	Chimie physique	SCHATZMAN ..	T	Astrophysique
BERTHELOT	T	Physique des particules fondamentales	TERMIER	T	Paléont. stratigraphique
BRICARD	T	Météorologie et Physique de l'Atmosphère	ZAMANSKY	T	Mathématiques générales
Mme ALBE- FESSARD	T	Psychophysiologie	LENNUIER	T	Physique (M.G.P.)
FRIEDEL	T	Phys. des Solides (Orsay)	RIZET	T	Génétique
M. JULIA	T	Etudes des Moléculaires naturelles complexes	ROUTHIER	T	Géologie appliquée
LENDER	T	Biologie anim. (S.P.C.N., Orsay)	Mme TONNELAT.	T	Physique théorique
MAGAT	T	Physico-chimie des radio-éléments	DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.)
Mlle QUINTIN ..	T	Electrochimie	SOUCHAY	T	Chimie générale
MONOD	T	Chimie du métabolisme	AIGRAIN	T	Electrotechnique générale
BENOIT	T	Physiol. anim. (Orsay)	BRUSSET	T	Chimie systématique
DE POSSEL	T	Analyse numérique	M. LÉVY	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
CHARLOT	T	Chimie analytique	Mme CHAIX ..	T	Chimie biologique
LEMÉE	T	Physiol. vég. (B.M.P.V., Orsay)	Mme HUREL-Py.		Biologie végét. (P.C.B.)
GUÉRIN	T	Chimie M.P.C. (Orsay)	PIAUX	T	Chimie (M.P.C.)
M. CHATELET ..	T	Chimie (P.C.B.)	BRUN	T	Mécanique théorique des fluides
JEAN	T	Physique nucl. (Orsay)	LEDERER	T	Chimie biologique
MATTLER	T	Physique (S.P.C.N.)	Mme DUBREIL ..	T	Mathématiques (Agré.)
BERGERARD	T	Zoologie (Orsay)	Mme LELONG ..	T	Mathématiques (E.N.S.)
BERTEIN	T	Electronique (Orsay)	BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.)
BOUSSIÉRES ...		Chimie des Radioéléments (Orsay)	COTTE	T	Physique électricité
Mme COUTURE .	T	Thermodynamique et Mécanique physique	J.-E. DUBOIS ...	T	Chimie organique
ELLENBERGER ..	T	Géologie des grandes régions du globe	LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.)
FRANC	T	Biologie animale (P.C.B.)	A. MICHEL	T	Chimie minérale (Orsay)
SCHNELL		Botanique trop. (Orsay)	OLMER	T	Energétique générale
STOLKOWSKI ...	T	Physiologie végétale	ROUAULT	T	Electricité (Orsay)
ACHER		Chimie biol. (Orsay)	GAUTHIER	T	Mécanique appliquée
BAUDOIN		Biologie animale (P.C.B.)	BARCHEWITZ ...	T	Chimie physique
BEAUMONT		Biologie anim. (S.P.C.N.)	BROSSEL	T	Physique atomique
BLAMONT	T	Géophysique Ionosphère	BUISER	T	Physiologie comparée
BOURREAU		Botanique	CAMUS	T	Physiol. végét. (B.M.P.V.)
D. CURIE		Physique (M.G.P.)	CASTAING	T	Physique II Thermod. (Orsay)
DURAND-DELGA .		Géologie	CURIEN	T	Minéralogie et Cristallographie
FREON	T	Chimie organ. (Orsay)	MOYSE	T	Physiol. végét. (Orsay)
HELLER	T	Physiologie végétale	NOIROT	T	Evolution des Etres org.
TORTRAT	T	Calcul des probabilités	PANNETIER	T	Chimie générale
CAILLEUX		Géologie (S.P.C.N.)	POSSOMPES	T	Zoologie
MAGNAN	T	Physique (S.P.C.N.)	PULLMANN	T	Chimie quantique
			TEILLAC	T	Physique nucléaire et Radioactivité
			TONNELAT	T	Biologie physico-chimique
			VILLE	T	Econométrie
			WILLEMART ...	T	Chimie (P.C.B.)
			DODE	T	Chimie (Orsay)
			FREYMANN	T	Recherches physiques

DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physique nucléaire	KOURGANOFF ..	T	Astronomie (Orsay)
Mlle FOURCROY		Biologie végét. (S.P.C.N.)	THIRY	T	Mécanique céleste
Mme CHOQUET-BRIUHAT	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste	ABELES		Physique (S.P.C.N.)
Mlle VEIL		Physiologie générale	AMAT		Physique (P.C.B.)
LWOFF	T	Microbiologie	AUBOIN		Géologie
SIESTRUNCK ...	T	Mécanique physique et expérimentale	Mme BENOIT-GUEITAL		Physique nucléaire et radioactivité
LACOMBE	T	Métallurgie des métaux nucléaires	BOUGIS		Biologie marine (Villefranche-sur-Mer)
BROCHARD	T	Physique (P.C.B., Orsay)	BRUHAT	T	Mathématiques (M.P.C.)
CABANNES	T	Mécanique générale	BRUNN	T	Géologie histor. (Orsay)
LESIEUR	T	Mathématiques I (Orsay)	CHABBAL		Physique (M.G.P., Orsay)
MAZET	T	Mécanique génér. (Orsay)	DEHEUVELS	T	Mathémat. propé. (Orsay)
CAIRE		Géographie physique et Géologie dynamique	D'ESPAIGNAT ...		Physique théor. (Orsay)
COMOLET	T	Mécanique des fluides	FURON		Géologie (S.P.C.N.)
CORABCEUF		Physiologie anim. (Orsay)	Mme GANS	T	Génétique
DELLOUE		Physique de l'exosphère	GENEVES		Biologie végétale (P.C.B.)
GORENFLOT		Botanique II (Orsay)	GUILBERT		Physiq. (C.U.S., Orléans)
HOULLON		Biologie animale (P.C.B.)	HUPE		Pétrographie
J. JULLIEN		Chimie (S.P.C.N., Orsay)	HOLLANDE	T	Biologie générale
MALGRANGE ...	T	Tech. math. de la Physique (Orsay)	LIONS	T	Analyse numérique
OLIVIER		Anthropologie	MAITTE		Chimie (P.C.B.)
NOZERAN	T	Botanique II (Orsay)	MEYER		Physique propédeutique
BLANC-LAPIERRE	T	Physique E.N.S. (Orsay)	NICOLAS		Géologie appliquée
CHEVAUGEON ..	T	Botanique (Orsay)	PANIGEL		Biologie générale
KAHANE	T	Mathématiques (Orsay)	RAVIER		Pétrographie
SAMUEL	T	Math. E.N.S. féminine	ROSEAU	T	Mécanique théorique des fluides
			ROUBINE		Electronique
			SILBER	T	Chimie (P.C.B.)
			UEBERSFELD ...	T	Electronique
			YVON	T	Théories physiques

Secrétaire général R. POUILLAIN

INTRODUCTION

Si les principales activités hormonales de la post-hypophyse connues actuellement ont été découvertes au début de ce siècle, la caractérisation chimique des substances responsables n'a commencé que depuis une dizaine d'années seulement. En effet, c'est en 1953 qu'ont été établies les structures complètes de l'ocytocine et de la vasopressine du bœuf grâce aux travaux de DU VIGNEAUD aux États-Unis, TUPPY en Autriche, et FROMAGEOT et son école en France. A cette époque, l'étude de la structure primaire des peptides et des protéines, c'est-à-dire l'enchaînement des acides aminés constitutants, n'était qu'à ses débuts et les informations de biochimie comparée pratiquement inexistantes dans ce domaine, de sorte qu'il était implicitement admis qu'à une activité biologique donnée devait correspondre une molécule définie. Les recherches ont été peu à peu étendues à différentes espèces de la classe des mammifères et il est apparu qu'un principe actif pouvait varier d'une espèce à l'autre tout en conservant l'activité biologique. L'intérêt de ces variations est multiple : au chimiste, elles peuvent révéler ce qui dans la molécule est fondamental parce qu'immuable et donner une orientation particulière aux synthèses qu'il envisage de réaliser afin de produire des substances plus actives ou plus simples que les substances naturelles ; au biochimiste, elles peuvent suggérer certaines règles concernant la biosynthèse des protéines ou bien lui permettre de préciser le mécanisme d'action commun d'une famille de peptides ; au biologiste enfin, elles peuvent donner un fil conducteur en ce qui concerne l'évolution d'une fonction par l'examen de l'évolution de l'agent responsable. Dans ce dernier cas, il est nécessaire qu'une comparaison puisse être faite non seulement entre espèces d'une même classe, mais encore entre espèces appartenant aux cinq classes de l'échelle des vertébrés.

Nos premières recherches ont été réalisées sur les hormones neurohypophysaires de trois espèces de mammifères : le cheval, le mouton et la baleine, de façon à compléter les résultats déjà obtenus

pour l'homme, le bœuf et le porc. Elles ont ensuite été étendues au poulet, à la grenouille et à trois espèces de poissons osseux marins. Les deux premières parties de cet exposé concernent la purification des principes actifs et décrivent d'une part les dosages biologiques qui ont été mis en œuvre pour suivre cette purification, d'autre part les opérations chimiques tout à fait particulières qui ont permis d'obtenir dix molécules à l'état pur.

La troisième partie concerne la détermination des structures des substances isolées. Si, chez les mammifères, les hormones se sont révélées identiques à celles déjà caractérisées chez le bœuf, par contre chez le poulet, la grenouille et les poissons, une hormone nouvelle, la vasotocine, a été purifiée et sa formule a été déterminée.

La quatrième partie est consacrée à l'examen des relations existant entre la structure et les activités biologiques à la lumière des propriétés pharmacologiques non seulement des hormones naturelles, mais également des analogues synthétiques préparés jusqu'à ce jour.

Nous essayons, en conclusion, de coordonner les résultats en fonction des conceptions génétiques actuelles sur l'évolution des espèces.

TECHNIQUES PHYSIOLOGIQUES

Chez les vertébrés, les extraits posthypophysaires possèdent plusieurs activités biologiques. Celles-ci ont permis l'élaboration de nombreux tests pharmacologiques qui se différencient par la nature et l'origine de l'organe récepteur. Chaque extrait a une action d'autant plus grande que le test choisi correspond à son activité prépondérante. Sur un même animal récepteur, l'effet sera variable suivant la nature des hormones qu'il renferme, cependant des hormones différentes peuvent avoir des activités identiques. Certaines hormones neurohypophysaires présentent cette particularité de posséder à des degrés divers plusieurs activités biologiques.

Le dosage biologique permet de les déceler avec une sensibilité qu'aucune méthode de dosage chimique ne peut atteindre. Ce fait est très largement exploité lors de leur purification et de leur isolement. Il convient de choisir parmi les tests ceux qui donnent les meilleurs dosages ; la technique biologique utilisée doit être avant tout fidèle, précise et spécifique. Elle doit présenter des avantages pratiques tels qu'une grande simplicité et une grande rapidité. Le test correspondant à l'action physiologique de l'hormone ne répond pas toujours à ces derniers critères.

Nous verrons tout d'abord les tests particuliers à chaque classe de vertébrés : mammifères, oiseaux, batraciens et poissons. Ces tests sont actuellement employés pour déceler et caractériser les activités des extraits posthypophysaires. Nous décrirons ensuite les trois dosages biologiques plus particulièrement utilisés au cours de ce travail.

CHAPITRE 1

Propriétés biologiques des extraits posthypophysaires dans les différentes classes de vertébrés

A) ACTIVITES BIOLOGIQUES CHEZ LES MAMMIFERES

Il est maintenant bien établi que les extraits posthypophysaires possèdent, chez les mammifères, quatre activités biologiques. Il s'agit : de l'activité ocytocique ou action sur la contraction de l'utérus, de l'activité vasopressique ou élévation de la pression sanguine chez un animal anesthésié, de l'activité lactagogue ou action sur l'expulsion du lait, de l'activité antidiurétique ou inhibition de la diurèse aqueuse.

1) **Activité ocytocique.**

Les extraits posthypophysaires agissent au niveau de l'utérus et leur action contracturante sur cet organe est dite : action ocytocique.

Sur l'organe isolé, l'amplitude de la contraction utérine peut être mesurée. Tout d'abord, DALE et al. [1, 2] ont utilisé l'utérus de cobaye et mis au point une technique de dosage. Quelques années plus tard, les proportions de sels contenus dans le liquide de survie étant modifiées, HOLTON [3] propose un dosage sur l'utérus de rate ; ce dernier présente moins de contractions spontanées et possède en outre une moins grande sensibilité à l'histamine. Récemment, MUNSICK [4] enrichit le liquide de survie en ions magnésium. Dans ces conditions, il observe des réponses variables suivant la nature de la molécule à activité ocytocique.

BERDE et CERLETTI [5] utilisent la lapine prégnante : la mise à bas est provoquée par l'injection d'extrait posthypophysaire, la

rapidité d'action étant fonction de la dose. Bien que plus spécifique, ce dosage délicat nécessite un grand nombre d'animaux et reste d'un emploi limité. BERDE l'a néanmoins adopté pour comparer quelques analogues synthétiques de l'ocytocine.

Nous avons utilisé la technique d'HOLTON pour déterminer l'activité de nos préparations.

2) **Activité vasopressique.**

Par injection intraveineuse, les extraits posthypophysaires provoquent une augmentation de pression sanguine mesurable chez le chien, le chat et le rat anesthésiés.

La méthode sur le chien est principalement due aux travaux de ROWE [6]. L'artère carotide d'un chien anesthésié est reliée à un manomètre à mercure qui permet l'enregistrement de la pression artérielle. Les injections de la solution standard et de la solution à doser se font successivement par la veine fémorale et les augmentations de pression obtenues sont comparées. La sensibilité de ce dosage est médiocre.

La méthode sur le chat a été particulièrement étudiée par HOG-BEN [7]. L'animal étant anesthésié à l'éther, la moelle épinière est sectionnée au-dessous de la seconde vertèbre cervicale. Les centres nerveux sont détruits et la respiration artificielle doit être établie. Bien que sensible, ce dosage nécessite un temps de latence d'une heure entre chaque mesure.

LANDGREBE et al. [8], après avoir utilisé le dosage sur le chat, ont décrit une technique sur le rat : l'animal est anesthésié par un mélange d'uréthane et de dérivés de l'acide barbiturique. Les nerfs pneumogastriques et les filets sympathiques sont sectionnés, le rat étant maintenu en respiration artificielle. Ainsi préparé, un rat peut survivre une dizaine d'heures et une quinzaine de réponses espacées de quinze minutes peuvent être mesurées. Cette méthode de dosage est plus pratique et plus sensible que celle utilisant le chat. Elle a cependant subi quelques légères modifications en ce qui concerne l'emploi des anesthésiques [9]. DEKANSKY [10], en particulier, utilise une anesthésie à l'uréthane par voie sous-cutanée. Les nerfs pneumogastriques sont laissés intacts et les effets du sympathique sont inhibés par des injections d'un adrénolytique, la dibénamine ou N-N-dibenzyl- β -chloroéthylamine. La respiration artificielle est alors supprimée.

Nous avons utilisé la technique de LANDGREBE légèrement modifiée pour le dosage de l'activité vasopressique de nos préparations.

3) **Activité lactagogue.**

Les extraits posthypophysaires agissent sur l'expulsion du lait chez la femelle allaitante.

D'après PETERSEN [11], au cours de l'allaitement normal, l'excitation de la mamelle, par la succion, provoque par voie réflexe la sécrétion d'ocytocine qui, à son tour, provoque la contraction musculaire de la glande mammaire. Par injection, chez une femelle allaitante, les extraits posthypophysaires peuvent provoquer la lactation et cet effet a été mis en évidence chez plusieurs mammifères.

Cette activité lactagogue (« Milk ejection ») a tout d'abord permis l'élaboration d'une technique utilisant la truie, animal qui, d'après BRAUDE et MITCHELL [12], convient bien au dosage car la lactation, mieux contrôlée que chez la vache, n'est jamais spontanée. WHITTESTONE [13] préconise le procédé suivant : on injecte dans la veine de l'oreille la solution à doser, une heure après l'allaitement normal, et on mesure la durée exacte de la lactation provoquée et les quantités de lait excrétées.

A l'heure actuelle, les déterminations de l'activité lactagogue se font sur un animal plus facile à manipuler : la lapine allaitante. Ainsi CROSS et VAN DYKE [14] utilisent la méthode mise au point par CROSS et HARRIS [15] sur cet animal et mesurent les variations de pression dans la glande mammaire. En effet, l'action directe des extraits sur les cellules myoépithéliales se traduit par une augmentation mesurable de la pression dans la glande : une lapine allaitante est anesthésiée par absorption par sonde stomacale d'éthanol, puis par injection intraveineuse d'uréthane dans la veine marginale de l'oreille. On place une canule dans un canal galactophore et les variations de pression observées après injection d'hormone sont enregistrées. Le seuil de réponse est atteint pour une injection de 5 μ u d'hormone, la réponse maximale se produisant pour 200 μ u.

Cette méthode de dosage est sensible et spécifique. Elle présente l'avantage de correspondre à l'action physiologique de l'ocytocine chez les mammifères.

4) **Activité antidiurétique.**

Les extraits posthypophysaires entraînent chez les mammifères une diminution du débit urinaire et une augmentation simultanée de la concentration du sodium dans l'urine : ils régularisent la diurèse. Une ingestion massive d'eau chez un animal est suivie, dans les cinquante minutes, d'une polyurie importante. Cette polyurie est inhibée par les

extraits posthypophysaires. L'action de l'hormone endogène étant préalablement bloquée par l'hydratation de l'animal, on peut ensuite évaluer l'activité antidiurétique.

Différentes techniques ont été utilisées. Elles diffèrent entre elles :

- par l'animal choisi ;
- par la méthode d'hydratation ;
- par l'index de dosage qui peut être soit la variation de vitesse du flot urinaire, soit les variations de la concentration en eau de l'urine. Ces dernières sont déterminées par mesure de pression osmotique ou mesure de densité [16] ;
- par la voie d'administration : l'injection intraveineuse serait une des conditions nécessaires pour que les résultats soient spécifiques et cohérents [17].

VAN DYKE et al. [17] ont mis au point une technique sur le chien conscient, hydraté, excréant l'urine à la vitesse de 5 ml par minute. Il réagit à 0,25 mu. Cette technique est couramment utilisée dans leur laboratoire.

BURN [18], le premier, a utilisé le rat : les animaux sont répartis en trois groupes de 4. Après administration de l'eau par sonde stomacale, un groupe reçoit l'extrait standard, un autre l'extrait inconnu, le troisième sert de lot témoin. Dans ce cas, le temps nécessaire à l'élimination de 50 % de l'eau administrée est proportionnel à l'activité antidiurétique de l'extrait. Les injections se font toutes par voie intrapéritonéale.

Dans la méthode de JEFFERS-LIVEZEY et AUSTIN [19], les injections sont faites par voie intraveineuse et le dosage s'effectue sur animal unique, anesthésié à l'alcool. DICKER [20] perfectionne ce dosage en maintenant l'hydratation du rat constante pendant toute la durée des mesures. Récemment, SAWYER [21] a repris cette technique : le rat hydraté par un mélange eau-alcool par sonde stomacale est maintenu à un degré constant d'hydratation, automatiquement dès que le poids varie. Toutes les cinquante minutes, les injections sont faites par la veine jugulaire ; la vessie étant cathétérisée et l'urètre étant ligaturée, l'urine excrétée est évaluée en goutte-minute. Quatre injections peuvent être faites sur un même animal : deux de la solution standard, deux de la solution inconnue. Un seul échantillon peut donc être dosé.

MOREL [22] utilise sur le rat un critère un peu différent : l'anti-diurèse est définie comme le temps séparant le moment de l'injection intraveineuse chez le rat de celui où la concentration en sodium de l'urine décroît, cette concentration en sodium étant suivie grâce au sodium marqué.

LINDQUIST et ROWE ont utilisé le lapin [23], HELLER et al, la souris [24].

Selon VAN DYKE [17], les sensibilités de ces différents dosages sont de :

- 0,5 mu à 2,5 mu chez le chien ;
- 0,1 mu à 0,4 mu chez le lapin ;
- 0,01 mu à 0,2 mu chez le rat ;
- 0,01 mu à 0,05 mu chez la souris.

Malgré la bonne sensibilité et la spécificité de ce dosage, le nombre même des techniques indique les difficultés de la mise au point. Le degré d'hydratation, l'état anesthésié ou éveillé de l'animal, le mode d'injection peuvent entraîner, en particulier, des variations dans les estimations.

B) ACTIVITES BIOLOGIQUES CHEZ LES OISEAUX

Les extraits post-hypophysaires agissent non seulement chez les mammifères, mais certaines activités peuvent être mises en évidence chez les oiseaux utilisés comme récepteurs. Ces actions sont particulières comme l'action dépressive sur la pression sanguine du poulet, ou identiques à celles trouvées chez les mammifères, comme l'action sur l'oviducte et l'activité antidiurétique.

1) Activité dépressive.

Les extraits posthypophysaires abaissent la pression sanguine chez les oiseaux et les premières observations ont été faites sur le canard par PATON et WATSON [25]. COON [26] a mis la méthode de dosage au point sur le poulet.

On utilise des coqs de 1,8 à 2,2 kg anesthésiés au phénobarbital. Les solutions sont injectées dans la veine crurale, la pression mesurée dans l'artère ischiatique est d'environ 105 mm Hg et les dépressions sous l'effet de l'hormone sont de l'ordre de 20 à 40 mm Hg. Une injection est faite toutes les cinq minutes. La dépression peut être suivie d'un effet pressique secondaire qui varie avec la pression de base.

D'après COON, les résultats sont comparables à ceux donnés par le dosage sur l'utérus de cobaye pour des extraits où le rapport de l'activité vasopressique à l'activité ocytotique est inférieure à 2,5.

Cette méthode est facile, rapide, mais assez peu spécifique. La sensibilité est médiocre, car il faut des doses de l'ordre de 100 μ pour obtenir une réponse. Cette technique est néanmoins recommandée par la pharmacopée américaine pour le dosage de l'ocytocine.

2) **Activité sur l'oviducte.**

Les extraits posthypophysaires ont sur l'oviducte de poule une action comparable à l'activité ocytocique sur l'utérus de rate.

HELLER et PICKERING [27] d'une part, et MUNSICK et al. [28] d'autre part, ont adapté le dosage de l'activité ocytocique *in vitro* à l'oviducte de poule. Des morceaux de 2 à 3 cm d'oviducte sont suspendus dans une cellule et plongent dans un liquide de survie de composition variable suivant les auteurs. Dans tous les cas, cette solution est appauvrie en calcium et contient du magnésium. La température de l'ensemble est maintenue à 43°. La méthode de dosage est identique à celle utilisant l'utérus de rate.

3) **Activité antidiurétique.**

L'action antidiurétique peut être mise en évidence. En effet, MUNSICK et al. [28] évaluent l'activité antidiurétique sur le poulet en hydratant l'animal par une solution hypotonique.

C) **ACTIVITES BIOLOGIQUES CHEZ LES BATRACIENS**

Les hormones neurohypophysaires interviennent dans la régulation de l'équilibre hydrominéral. Chez les batraciens, elles agissent plus particulièrement sur la peau, sur l'épithélium vésical et sur le tubule rénal.

1) **Activité nutritiférique.**

A travers la peau de grenouille, s'effectue de l'extérieur vers l'intérieur un transport actif de sodium : transport dit « actif », car il se fait contre un gradient électrochimique et nécessite de l'énergie. D'après USSING [29], la peau de grenouille en survie se comporte comme une « pile à sodium » et, en absence de tout gradient électrochimique, on observe un flux net de sodium dont l'intensité est exac-

tement mesurée par le courant qui traverse la peau (courant de court circuit). Si on met en contact un extrait posthypophysaire avec la face interne de la peau, le courant augmente : cet effet a été dénommé « activité natriférique » par MAETZ et al. [30]. D'après LEAF et al. [31], cette augmentation du transport actif de sodium s'accompagne d'une consommation d'oxygène plus élevée. Cette propriété est fonction de la dose et peut servir de méthode de dosage. MAETZ et al. [30] utilisent ce procédé en adoptant le dispositif mis au point par USSING [29] et en le perfectionnant par l'addition d'un servo-mécanisme pour mesurer les flux nets de sodium.

La vasopressine n'ayant qu'une très faible action, la substance de référence plus couramment utilisée est l'ocytocine de bœuf. Les hormones neurohypophysaires peuvent être caractérisées par leur rapport :

$$\frac{\text{activité natriférique}}{\text{activité ocytocique}}$$

qui, par définition, est de 1 pour l'ocytocine des mammifères.

2) Activité hydro-osmotique.

Chez les amphibiens, les hormones neurohypophysaires semblent exercer une action particulière sur la perméabilité à l'eau de certaines membranes.

En effet, après injection d'hormone neurohypophysaire, on peut mettre en évidence un passage accru de l'eau au niveau de la peau de l'animal et au niveau de l'épithélium vésical. A l'opposé de l'activité natriférique, ce transport est un phénomène passif qui suit les lois de l'osmose et traduit ce que nous appelons « l'effet hydro-osmotique ».

Cette action hydroosmotique peut se mesurer sur l'animal entier (« water balance activity » des auteurs anglo-saxons) ou sur l'épithélium vésical en survie (« frog bladder activity »).

a) SUR L'ANIMAL ENTIER :

BRUNN [32] avait observé que les batraciens maintenus dans l'eau augmentent de poids après une injection d'extrait posthypophysaire.

BOYD et al. [33] d'une part, HELLER [34] d'autre part, ont utilisé cette observation et mis au point une méthode de dosage.

Des grenouilles sont réparties en plusieurs lots et sont placées dans des béciers contenant de l'eau distillée. Les grenouilles de

chaque lot reçoivent une injection de l'extrait standard ou de la solution à doser. Après un temps donné, l'augmentation de poids est fonction de la dose injectée.

b) SUR L'ÉPITHÉLIUM VÉSICAL :

SAWYER et al. [35] ont montré que si on injecte des extraits posthypophysaires à un batracien, l'eau contenue dans la vessie peut être réabsorbée, ceci par augmentation de perméabilité de la paroi vésicale.

Des méthodes de dosage utilisent cette propriété sur l'organe isolé. La vessie, contrairement à la peau, possède une structure simplifiée et très peu glandulaire. Lorsque remplie d'eau, elle est immergée dans un milieu hypertonique, la sortie de l'eau du milieu interne entraîne une diminution de poids qui est fonction de la quantité d'extrait posthypophysaire placée dans le milieu extérieur.

Deux techniques de dosage ont été mises au point. Elles diffèrent par l'origine du récepteur :

- BENTLEY [36] a montré que la vasopressine agissait non seulement sur le crapaud entier, mais aussi sur la vessie isolée [37]. Les vessies de crapaud, *Bufo marinus*, sont cathétérisées pour faciliter leur dissection. Elles sont accrochées sur un tube de verre, remplies de solution de Ringer au 1/5^e, placées dans des tubes contenant 30 ml de solution de Ringer non diluée et aérée par barbotage d'air. Après une heure d'équilibration, les vessies sont pesées, l'extrait hormonal est ajouté à la solution externe et 40 minutes après les vessies sont à nouveau pesées. Elles sont ramenées à leur poids initial par addition de solution de Ringer au 1/5^e, et lavées pendant 30 minutes. Il est à noter que la vasopressine des mammifères est active mais non l'ocytocine. RASMUSSEN et al. [38] utilisent cette méthode sur le crapaud en la modifiant : les deux lobes de la vessie étant séparés, un dosage comparatif est effectué sur chaque lobe.
- SAWYER [39] a adapté cette technique à la grenouille *Rana catesbiana* et montré que dans ce cas l'ocytocine accélère le passage de l'eau à travers la membrane vésicale. Il a modifié la composition de la solution de Ringer utilisée par BENTLEY [37] et pris comme mesure la diminution de poids entre 15 et 45 minutes.

3) Activité antidiurétique.

Comme chez les mammifères ou chez les oiseaux, les extraits posthypophysaires agissent chez les batraciens sur la diurèse.

SAWYER [40] a étudié le mécanisme de cette action antidiurétique en suivant la « clearance » de la créatinine, de l'inuline et de l'eau libre chez le crapaud non anesthésié, les urines étant collectées directement dans les uretères pour éviter la réabsorption à travers la vessie. Il constate, sous l'action des extraits posthypophysaires, une diminution de la clearance de l'eau libre.

A la suite de ces observations, URANGA et al. [41] ont mis au point un dosage antidiurétique sur la grenouille *Rana catesbiana*.

Des grenouilles mâles *Rana catesbiana* sont anesthésiés par immersion dans du méthane-sulfonate de tricaïne en solution à 0,2 %. Les deux uretères sont canulés et un cathéter est placé dans le sac lymphatique ventral. Un à huit jours après l'opération, les mesures de flot urinaire sont faites sur l'animal conscient, les urines étant collectées toutes les quinze minutes. Après injection d'extrait posthypophysaire, la réponse est calculée comme étant le rapport de l'urine recueillie une heure après l'injection sur la quantité d'urine excrétée une heure avant. L'auteur observe dans certains cas, après injection hormonale, une diurèse en grande partie inexpliquée.

JARD et al. [42] utilisent un dosage antidiurétique sur la grenouille en adaptant la méthode de mesure de clearance utilisée par SAWYER [40] sur le crapaud.

D) ACTIVITES BIOLOGIQUES CHEZ LES POISSONS

Les activités biologiques des extraits posthypophysaires chez les poissons n'ont pas encore été très largement étudiées et peu de tests ont été élaborés.

Toutefois, WILHELMI, PICKFORD et SAWYER [43] ont mis en évidence une activité sexuelle sur un poisson : *Fundulus heteroclitus*.

Au moment du frai, poissons mâles et femelles se juxtaposent et prennent une position en S. Les spermatozoïdes d'une part, et les œufs d'autre part, sont émis dans le milieu extérieur alors que le couple est agité de spasmes. Par injection d'extrait posthypophysaire, on peut provoquer chez un poisson isolé, mâle ou femelle, ce même réflexe spasmodique dit « Spawning reflex ». Cette action est mesurable et WILHELMI, PICKFORD, SAWYER [43] ont défini une unité *Fundulus* : c'est la quantité de matériel donnée par g de poids de poisson qui déclenche le réflexe spasmodique sexuel chez 40 à 60 % des animaux mis en expérience, dans les quarante minutes qui suivent l'injection intrapéritonéale.

Ce test est encore très peu utilisé comme méthode de dosage.

CHAPITRE II.

Dosages biologiques utilisés

Chaque test peut servir de base à un dosage biologique si l'amplitude des réponses est évaluée par rapport à une substance de référence. Pour les hormones neurohypophysaires, le standard (standard U.S.P.) est constitué par une poudre acétonique posthypophysaire de bœuf titrant par convention 2 unités au milligramme de chacune des activités. La préparation de la solution standard (1 mg/ml) est effectuée suivant les indications de la pharmacopée américaine [44] : la poudre est extraite par de l'acide acétique à 0,25 %, la suspension étant maintenue cinq minutes dans un bain-marie bouillant. Plus couramment, nous utilisons comme standard une poudre de bœuf titrée périodiquement contre le standard U.S.P. : il possède une unité au milligramme de chacune des activités.

Nous avons choisi pour doser les activités biologiques des solutions : l'activité ocytotique sur l'utérus de rate, l'activité vasopressique sur le rat et l'activité hydroosmotique mesurée sur la vessie de grenouille.

A) DOSAGE DE L'ACTIVITE OCYTOTIQUE

L'activité ocytotique de nos préparations est déterminée sur l'utérus de rate, suivant la technique d'HOLTON [3].

Des rates impubères de 80 à 170 g sont employées et, de préférence, choisies au stade de diœstrus [45]. La rate tuée par décapitation, une des cornes utérines est rapidement prélevée, dégraissée et placée dans une cellule de 15 ml remplie de liquide de survie. Un barbotage d'air assure en même temps l'aération et l'agitation. L'ensemble plonge dans un bain thermorégulé à 32°. La corne utérine

est soumise à une traction constante, sur laquelle il est possible de jouer pour modifier l'amplitude des réponses. Les contractions sont enregistrées sur un cylindre noirci, par l'intermédiaire d'un levier amplificateur. La température du bain est fixée à 32° car la sensibilité et la spécificité sont fonction de la température. Le liquide de survie utilisé est constitué par la solution de DE JALON [46] dont la composition est celle du liquide de Loke appauvrie en chlorure de calcium et en glucose dans les proportions respectives de 1/4 et 1/2, afin de diminuer les contractions spontanées de l'organe. La composition est la suivante (pour 1 litre de soluté) :

— chlorure de calcium	0,06 g
— chlorure de potassium	0,42
— bicarbonate de sodium	0,50
— glucose	0,50
— chlorure de sodium	9,00

Le principe du dosage est d'encadrer la réponse de la solution à doser par deux doses de standard aussi peu différentes que possible. Pour que le dosage reste valable, il faut que la réponse soit inférieure à 80 % de la contraction d'amplitude maximum et que le dosage se fasse le plus près possible du seuil de réponse. Les mesures sont faites toutes les trois minutes pour avoir un temps de latence constant.

Les meilleures déterminations se font sur les cornes utérines ayant une gamme de réponse entre 2 mu et 6 mu. Le seuil de réponse étant de l'ordre de 0,5 mu à 2 mu (pour les 15 ml de la cellule), la sensibilité de la méthode peut être accrue par réduction du volume de la cellule contenant la corne utérine.

La précision est de l'ordre de 15 % et la spécificité de ce dosage est particulière. En effet, l'activité ocytotique ne caractérise pas une hormone unique ; les trois hormones neurohypophysaires actuellement isolées possèdent cette activité à des degrés divers.

B) DOSAGE DE L'ACTIVITE VASOPRESSIQUE

L'activité vasopressique est déterminée chez le rat anesthésié selon la technique de LANDGREBE [8] légèrement modifiée.

Des rats mâles de 260 g à 350 g sont utilisés. L'animal est endormi après l'injection intrapéritonéale de 180 mg pour 100 g de poids d'éthyluréthane en solution aqueuse à 50 %. Pour compenser le choc opératoire, le rat est maintenu à 37°. La trachée-artère est

dégagée, puis incisée pour faciliter la respiration de l'animal. Les injections intraveineuses se font par la veine de la verge et par l'intermédiaire d'une canule de 9/10^e. Après injection de 500 U d'héparine (Liquémine Roche), une des carotides est dégagée, puis ligaturée, et une pince hémostatique est placée quelques centimètres plus bas. L'artère complètement sectionnée entre la ligature et la pince, on introduit une canule de 7/10^e. La carotide est alors reliée à un manomètre à mercure dont le levier flotteur transmet les variations de pression à un cylindre enregistreur garni d'un papier métallisé.

Dans ces conditions, c'est-à-dire en effectuant une anesthésie plus profonde du rat et en évitant de couper les filets sympathiques et parasympathiques, on observe que la pression de base reste constante (80 mm Hg environ). La sensibilité du dosage est dans une certaine mesure fonction de cette pression de base. Le principe du dosage étant le même que celui énoncé lors du dosage de l'activité ocytotique, nous dosons entre 5 μ u et 15 μ u, soit 7 mm et 18 mm Hg de variation de pression. Il convient de noter que les volumes des injections ne doivent pas dépasser 0,2 ml ; pour être comparés, les volumes des solutions de standard et de l'inconnu doivent être identiques.

La précision de ce dosage est de l'ordre de 15 %, mais il est dix fois moins sensible que le dosage de l'activité ocytotique. En ce qui concerne la spécificité, l'activité vasopressique ne caractérise pas une seule hormone neurohypophysaire : parmi les trois hormones actuellement isolées, deux d'entre elles possèdent une activité vasopressique prépondérante.

C) DOSAGE DE L'ACTIVITE HYDRO-OSMOTIQUE

Nous avons tout d'abord utilisé la méthode de HELLER [34] sur la grenouille pour le dosage de l'activité hydroosmotique. Suivant cette technique, une augmentation de poids de l'animal entier traduit la variation de perméabilité à l'eau provoquée par une injection d'extrait posthypophysaire.

Des doses croissantes d'extrait standard sont injectées dans le sac lymphatique dorsal de grenouilles pesées et réparties en groupes de 3 à 5 dans des béciers contenant de l'eau distillée. Après 1 h 30, on observe des augmentations de poids allant de 4 à 16 %. Cette augmentation (g %) varie en fonction du logarithme de la dose de

standard injecté. Cependant la réponse biologique individuelle étant assez variable, un grand nombre d'animaux est nécessaire pour obtenir une précision convenable.

Nous avons préféré adopter la technique sur vessie isolée de grenouille, utilisée par SAWYER [39]. L'augmentation de perméabilité est alors appréciée par la diminution de poids d'une vessie isolée, remplie d'eau et plongeant dans un milieu hypertonique auquel l'extrait posthypophysaire est ajouté.

Des grenouilles (*Rana esculenta*) sont soit anesthésiées par immersion dans une solution de tricaïne-méthylsulfonate à 0,2 %, soit décérébrées. Les vessies sont soigneusement prélevées et fixées sur une canule de verre qui pénètre par la papille urinaire.

On introduit dans la vessie 8 ml d'eau distillée pour augmenter le gradient osmotique et les vessies sont immergées dans 50 ml d'une solution de Ringer de composition suivante :

— chlorure de sodium	0,80 m M
— chlorure de potassium	2,5 m M
— chlorure de calcium	1,8 m M
— bicarbonate de sodium	24 m M
— phosphate monosodique	0,1 g
— glucose	0,2 g

pour 1 litre d'eau distillée

Le tampon est aéré par barbotage avec de l'air comprimé pendant 15 minutes et son pH est ajusté à 7,4.

L'ensemble canule-vessie est pesé ; une nouvelle pesée après 15 minutes dans le tampon permet de calculer la sortie d'eau qui, en absence d'hormone, doit être inférieure à 5 μ l/mn. Après addition de l'hormone, le passage de l'eau à travers la vessie augmente dans le sens de la muqueuse vers la séreuse. On évalue cette augmentation de perméabilité en faisant trois pesées successives à des intervalles de 15 minutes et on prend pour mesure la vitesse de sortie de l'eau entre le temps 15 mn et 45 mn. On rince la vessie en renouvelant la solution de Ringer, puis on ajoute de l'eau distillée à l'intérieur de la vessie pour revenir au poids initial. La sortie de l'eau étant à nouveau inférieure à 5 μ l/mn, on peut effectuer un nouvel essai. En opérant ainsi, il est possible d'effectuer quatre essais. Dans la zone de sensibilité (de 5 μ u/ml à 20 μ u/ml), 1 μ u/ml provoque une sortie d'eau de l'ordre de 1 μ l/mn. Chaque dosage nécessite une série de six vessies.

Le principe du dosage est le suivant : après détermination du seuil pour chaque vessie, on introduit successivement la solution standard et celle de l'inconnu à titrer. Deux doses de l'inconnu doivent donner les mêmes réponses que deux doses de standard dans un rapport de deux.

Une fois de plus, la spécificité de ce dosage n'est pas absolue, les trois hormones neurohypophysaires ayant une action. Il faut noter que la vasotocine possède une activité hydroosmotique 200 fois plus forte que celle de l'ocytocine.

Au cours de ce travail, nous avons largement utilisé le dosage de l'activité ocytocique et celui de l'activité vasopressique. Les poudres acétoniques des différentes espèces ont été successivement titrées. Le *tableau I* indique les résultats obtenus. Les deux activités sont du même ordre, avec une exception en ce qui concerne la poudre posthypophysaire de baleine. Les poudres acétoniques des différentes espèces titrent de 0,2 u/mg à 1 u/mg. Les différences observées proviennent probablement le plus souvent du traitement antérieur : prélèvement plus ou moins rapide des glandes, prélèvement de l'hypophyse entière (poissons osseux).

Les dosages décrits ont été systématiquement employés pour suivre la purification des hormones et déterminer le rendement en principes actifs, après chaque opération de fractionnement.

Tableau I
Activités biologiques des poudres post-hypophysaires
de quelques vertébrés

	Activité ocytocique (u/mg)	Activité vasopressique (u/mg)
Mammifères :		
- Boeuf	1,0	1,1
- Porc	1,4	1,4
- Cheval	0,9	0,8
- Mouton	0,8	0,8
- Baleine	0,5	2,5
- Rat	3,2	3,2
Oiseaux :		
- Poulet	0,4	0,4
Batraciens :		
- Grenouille	1,2	1,0
*Poissons osseux :		
- Merlu	0,5	0,3
- Tacaud	0,5	0,5
- Lieu noir	0,5	0,5
*Poissons cartilagineux :		
- Raie	0,005	Dépressive
- Chien de mer	0,010	0,007

* Poudre d'hypophyse entière.

**ISOLEMENT
DES HORMONES NEUROHYPOPHYSAIRES
DES MAMMIFERES, DES OISEAUX,
DES BATRACIENS ET DES POISSONS**

Une étude de biochimie comparée des hormones neurohypophysaires nécessite une technique d'isolement simple, fournissant de bons rendement et applicable à des quantités très faibles de matériel.

Il y a quelques années, DU VIGNEAUD et ses collaborateurs [47, 48] d'une part, FROMAGEOT et son école d'autre part [49, 50], ont obtenu les hormones neurohypophysaires du bœuf dans un état hautement purifié. Deux peptides actifs : l'ocytocine et la vasopressine ont été isolées. Après extraction d'une poudre acétonique posthypophysaire par de l'acide acétique à 0,25 % à chaud, les peptides actifs ont été séparés et purifiés par des techniques faisant appel à des précipitations fractionnées au moyen de solvants organiques, des adsorptions sélectives, des distributions par contre-courant. Ces procédés relativement laborieux ont cependant permis d'isoler des quantités d'hormones suffisantes pour entreprendre l'étude de leur constitution chimique.

Plus récemment, certains auteurs ont envisagé des techniques différentes. A partir d'extrait commercial de bœuf (protopituitrin), WARD et GUILLEMIN [51] obtiennent une purification de la vasopressine par chromatographie sur carboxyméthylcellulose. SCHALLY et al. [52] séparent l'ocytocine et la vasopressine à partir de ce même extrait par une méthode voisine. La première hormone éluee (l'ocytocine) est soumise à une seconde chromatographie sur carboxyméthylcellulose. La pureté des produits obtenus n'a pas été étudiée. PORATH [53] effectue une extraction de la poudre acétonique posthypophysaire de porc avec de l'acide acétique concentré et fractionne l'extrait obtenu à l'aide d'acétone puis d'éther. L'ocytocine est ensuite isolée par combinaison d'une chromatographie sur triéthylamino-éthyl-cellulose et d'une électrophorèse de cinq jours sur cellulose. La vasopressine est isolée par un procédé plus complexe. Après chromatographie sur diéthylamino-éthyl-cellulose, puis sur sulfométhyl-cellulose, le filtrat obtenu est soumis à une électrophorèse sur cellulose. Les rendements des deux hormones ne sont pas calculés.

Toutes ces méthodes sont difficilement utilisables lorsque la matière première est peu abondante. ACHER, LIGHT et DU VIGNEAUD

[54] ont mis au point une technique permettant d'obtenir rapidement avec un rendement élevé les hormones du bœuf et du porc. En effet, la mise en évidence d'une association particulière entre les peptides actifs (l'ocytocine et la vasopressine) d'une part, et d'une protéine de la posthypophyse (neurophysine) d'autre part, a suggéré à ces auteurs un procédé de purification entièrement nouveau.

En effectuant une extraction avec de l'acide sulfurique dilué et en purifiant l'extrait obtenu par précipitation fractionnée au moyen du chlorure de sodium, VAN DYKE [55] avait isolé une protéine homogène qui possédait les activités ocytocique et vasopressique. ACHER, CHAUVET et OLIVRY [56] ont ensuite montré que l'activité de la protéine était due à deux peptides actifs : l'ocytocine et la vasopressine qui pouvaient être détachés de la protéine inerte par les techniques suivantes : dialyse contre de l'acide acétique dilué, distribution par contre-courant, précipitation par addition d'acide trichloracétique, électrophorèse et électrodialyse. Cette association particulière qui résiste à la dialyse contre l'eau, à l'ultrafiltration et à la précipitation au moyen du chlorure de sodium, permet de séparer les deux peptides actifs de la masse des peptides neurohypophysaires [57].

La purification des deux hormones neurohypophysaires peut donc s'effectuer en trois étapes : la préparation du complexe actif, l'élimination de la protéine support et la séparation des peptides actifs par une seule chromatographie sur Amberlite IRC 50 [58]. Dans ces conditions, l'ocytocine et la vasopressine de bœuf sont obtenues avec un rendement satisfaisant.

Ce procédé a été largement utilisé au cours de ce travail avec néanmoins quelques modifications concernant la précipitation du complexe actif.

CHAPITRE 1

Isolement des hormones des mammifères

Après la mise au point d'un procédé simple de purification des hormones neurohypophysaires à partir de glandes de bœuf et de porc, une étude comparée des hormones de quelques mammifères a pu être envisagée.

Les possibilités d'étude sont multiples et variées, les mammifères étant composés d'ordres très différents. Elles sont néanmoins limitées par la difficulté que représente la collecte des glandes.

L'isolement des hormones neurohypophysaires a été réalisé sur un équidé : le cheval, sur un ruminant : le mouton, et sur un cétacé : la baleine à nageoire.

A) ISOLEMENT DES HORMONES DU CHEVAL

Les posthypophyses de cheval sont bien différenciées et se séparent facilement des lobes antérieurs. Elles sont de taille voisine de celles du bœuf.

La poudre acétonique posthypophysaire a été préparée de la manière suivante : les hypophyses fraîches sont placées dans de l'acétone pure et refroidie (1 litre p. 100 g), puis après vingt-quatre heures, les lobes antérieurs et postérieurs sont séparés et les posthypophyses sont remises dans l'acétone (1 litre p. 200 pendant trois jours). Après un troisième passage dans l'acétone, dans les mêmes conditions, les glandes sont amenées à dessiccation totale par lyophilisation.

Les posthypophyses séchées sont reçues au laboratoire où elles sont finalement pulvérisées. La poudre acétonique posthypophysaire obtenue titre :

- 0,9 u/mg en activité ocytotique ;
- 0,8 u/mg en activité vasopressique.

Deux lots * d'origine différente ont été employés. Six préparations utilisant 10 g à 100 g de poudre acétonique (trois préparations par lot) ont été effectuées.

1) Préparation du complexe actif.

La préparation du complexe actif est effectuée en utilisant le procédé de purification par précipitation fractionnée au moyen du chlorure de sodium décrit par ACHER, CHAUVET et OLIVRY [56] : après une précipitation au moyen du chlorure de sodium à 10 g p. 100 de l'extrait, on recueille la fraction qui précipite entre 2,5 et 6,5 p. 100.

100 grammes de poudre acétonique posthypophysaire sont extraits sous agitation, après malaxage, une première fois avec 3 litres d'acide sulfurique 0,01 N refroidi (18 heures), puis après séparation du culot par centrifugation, une deuxième fois avec 1,5 litre d'acide (15 heures). Après centrifugation, les deux solutions surnageantes sont réunies et l'extrait sulfurique obtenu (volume = 4,2 litres) a un pH de l'ordre de 4,7. Le pH est ajusté à 3,9 par 7 à 14 ml d'acide sulfurique normal et on ajoute du chlorure de sodium de façon à avoir une teneur de 10 p. 100 en sel. On laisse la précipitation s'effectuer pendant cinq à six heures. Le précipité centrifugé est recueilli, mis en suspension dans 400 à 600 ml d'eau distillée et dialysé contre de l'eau distillée jusqu'à élimination totale des chlorures (3 fois quatre heures). La solution dialysée de pH 4,5 est ramenée à 3,9 par quelques gouttes d'acide acétique glacial, puis le volume est porté à 2 litres ; on ajoute alors un volume égal de tampon acétate de sodium molaire pH 3,9. Une première addition de chlorure de sodium, de façon à avoir une teneur de 2,5 %, permet d'éliminer après trois heures un léger précipité très pigmenté. Sur la solution surnageante, on effectue alors une deuxième addition de chlorure de sodium pour amener la teneur à 6,5 p. 100. On laisse une nuit au frigidaire. Le précipité formé est recueilli après centrifugation. Il est mis en suspension dans 200 ml d'eau distillée, puis redissous à l'aide d'une ou deux gouttes d'acide acétique glacial et on ajoute un volume égal de tampon acétate de sodium molaire pH 3,9. Par addition de chlorure de sodium 6,5 p. 100, on précipite le complexe actif. Après trois heures, on recueille le précipité et on répète trois fois l'opération précédente en réduisant le volume de moitié. Le précipité final est repris dans 80 ml d'eau distillée et dialysé contre l'eau distillée jusqu'à élimination totale des chlorures. Il est ensuite lyophilisé.

(*) Nous sommes heureux de remercier les Etablissements CHOAY qui ont assuré la collecte et le traitement des glandes.

Le *Tableau II* indique les résultats obtenus pour une des six préparations effectuées.

Par cette méthode, on obtient, comme le montre le *Tableau III*, de 0,6 à 1,8 g de complexe actif à partir de 100 g de poudre acétonique. Le rendement est variable suivant le lot de poudre acétonique utilisé. Ce complexe titre en moyenne :

- 20 u/mg en activité ocytotique ;
- 10-15 u/mg en activité vasopressive.

2) Elimination de la protéine support.

La dissociation du complexe est effectuée soit par électrodialyse, soit par précipitation de la protéine support au moyen de l'acide trichloracétique à 5 %.

a) ELECTRODIALYSE :

20 à 100 mg de complexe actif de cheval sont dissous dans 0,5 ml d'acide acétique 0,5 % puis, le volume étant ajusté à 35 ml par addition d'eau distillée, la solution est placée dans le compartiment central d'un appareil d'électrodialyse à trois compartiments.

Le compartiment anodique contient d'abord 50 ml d'eau distillée, puis 50 ml d'acide acétique 0,5 %. Le compartiment cathodique contient 50 ml d'eau distillée, les membranes sont en cellophane. La tension appliquée est de 800 à 1.000 V. Une circulation d'eau évite un trop grand échauffement et l'intensité ne dépasse pas 25 mA, afin que la température ne s'élève pas au-dessus de 25°. L'opération dure en moyenne dix heures.

Dans ces conditions, la protéine support reste dans le compartiment central et on recueille les peptides actifs dans le compartiment cathodique avec des rendements différents d'un essai à l'autre et variables pour chacune des activités biologiques (cf. *Tableau IV*). La solution cathodique est concentrée sous vide.

L'examen du matériel cathodique par ionophorèse sur papier Whatman n° 1 (tampon acétate de pyridine, pH 3,45, 10 volts/cm pendant cinq heures) indique, après révélation au bleu de bromophénol [59], la présence seulement de deux substances peptidiques. Ces deux substances ont des comportements ionophorétiques identiques respectivement à ceux de l'ocytocine et de la vasopressine du bœuf [56]. L'ionogramme est découpé en bandes de 1 cm et les bandes sont éluées par de l'acide acétique 0,25 %. On effectue les dosages biologiques sur les éluats. L'activité ocytotique est présente

Tableau II
Préparation du complexe actif de cheval

	Poids (g)	Activité ocytocique		Activité vasopressique	
		en u	en % de l'activité initiale	en u	en % de l'activité initiale
Matériel extrait par l'acide sulfurique 0,01 N	7,5	40.000	44	41.000	51
1ère précipitation par chlorure de sodium 10 %	2,8	30.000	33	26.000	32
2ème précipitation par chlorure de sodium 2,5 % à 6,5 %	1,1	25.000	28	12.800	16
6ème précipitation par chlorure de sodium 6,5 %	0,8	16.000	18	9.800	13

(Préparation n° V : 100 g de poudre acétonique post-hypophysaire)

Tableau III
Caractéristiques du complexe actif de cheval
déterminées sur 6 préparations

Préparation	Poids de complexe (g) calculé pour 100 g	Activités en u/mg		Rendements en % des activités initiales	
		Activité ocytocique	Activité vasopressique	Activité ocytocique	Activité vasopressique
I	0,677	25	14	19	12
II	1,880	25	15	52	35
III	1,480	20	10	33	19
IV	0,697	21	10	16	9
V	0,790	20	12,5	18	13
VI	0,590	20	10	13	8

uniquement au niveau de la substance la moins basique et l'activité vasopressique est présente uniquement au niveau de la substance la plus basique (*fig. 1*).

Ce procédé permet de préparer de petites quantités de principes actifs. Cependant, l'électrodialyse se prête difficilement à des opérations à grande échelle, la membrane cathodique se colmatant facilement. La précipitation au moyen de l'acide trichloracétique à 5 % s'est révélée un moyen plus rapide et plus efficace pour éliminer la protéine support.

b) PRÉCIPITATION PAR L'ACIDE TRICHLORACÉTIQUE A 5 % :

50 mg à 700 mg de complexe actif de cheval sont dissous dans de l'acide acétique 0,25 % à raison de 10 à 14 ml pour 100 mg. On ajoute alors une solution d'acide trichloracétique 100 p. 100 (P/V) de façon à obtenir une concentration finale de 5 p. 100 en acide trichloracétique. Après une agitation de dix minutes au froid, la suspension est rapidement centrifugée à $+5^{\circ}\text{C}$. Le culot est remis en suspension dans le même volume d'acide acétique 0,25 % et on répète une précipitation dans des conditions identiques. La protéine précipitée est alors éliminée et mise à dialyser contre de l'eau distillée. Les solutions surnageantes sont passées sur une colonne d'Amberlite IR 45 ($1,5 \times 10$ cm), forme acétate, de façon à éliminer rapidement l'acide trichloracétique. On lave ensuite la colonne d'Amberlite par un égal volume d'eau distillée. Les hormones ne sont pas fixées sur l'Amberlite et se trouvent dans le filtrat dont le pH varie de 3,2 à 3,6 suivant les essais.

Comme l'indique le *Tableau V*, ce filtrat contient 65 à 100 % des activités du complexe initial.

3) Séparation de l'ocytocine et de la vasopressine.

La purification finale des deux hormones contenues dans la solution surnageante, après dissociation au moyen de l'acide trichloracétique à 5 % du complexe actif de cheval, est réalisée par chromatographie sur Amberlite IRC 50 [58].

L'échangeur est traité suivant HIRS et al. [60] et tamisé sous forme de sel de sodium. La fraction passant au tamis 100 est utilisée.

On fait passer sur une colonne de résine forme H ($0,9 \times 10$ cm) la solution contenant les hormones à une vitesse de 15 ml/heure environ. Les peptides demeurent adsorbés au sommet de la colonne et aucune activité biologique n'est trouvée dans le filtrat. On équilibre

Tableau IV

Electrodialyse du complexe actif de cheval

Essai	Poids de complexe actif initial (mg)	Rendement en activité ocytocique en % de l'activité initiale	Rendement en activité vasopressique en % de l'activité initiale
1	20	96	56
2	30	100	53
3	30	100	58
4	30	67	51
5	30	42	93
6	50	98	65
7	30	55	80
8	50	32	100
9	100	87	100
10	100	30	85
11	50	65	66

Tableau V

Activités ocytocique et vasopressique recueillies dans la solution surnageante après précipitation de la protéine support de cheval par l'acide trichloracétique à 5 %

Quantité de complexe (mg)	Activité ocytocique		Activité vasopressique	
	en u	en % de la quantité initiale	en u	en % de la quantité initiale
50	650	65	490	98
200	3.200	80	2.400	100
300	4.000	80	2.100	70
550	9.700	85	4.800	87
700	11.500	80	9.700	75

Matériel cathodique

Bande témoin découpée et révélée
au bleu de bromophénol

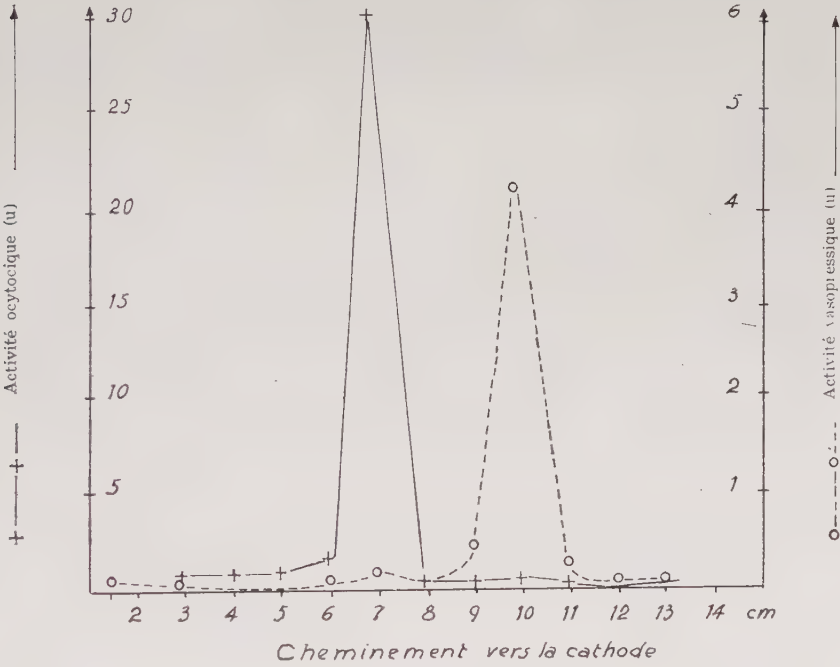
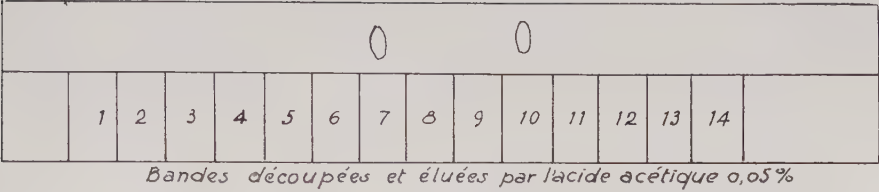


Figure 1 : Ionophorèse sur papier du matériel cathodique obtenu après électrodialyse d'une solution de complexe actif de cheval
— pH = 3,45 tampon acétate de pyridine M; — 10 volts/cm; — 5 heures

alors la résine avec un tampon acétate d'ammonium * 0,1 M pH 5,0 (70 ml à 80 ml de tampon passés à la vitesse d'une goutte par minute sont nécessaires). On établit ensuite un gradient de pH et de force ionique avec un tampon acétate d'ammonium pH 7,7 0,5 M, la chambre de mélange étant de 50 ml. On recueille des fractions de 1 ml sur un appareil collecteur de fractions Technicon, la vitesse d'écoulement de la colonne étant maintenue à 3 ml/heure. Lorsque 170 ml sont élués de la colonne, on établit un gradient de force ionique plus élevé à l'aide d'un tampon 0,75 M pH 7,7 acétate d'ammonium. On détermine la présence des peptides dans les tubes collectés, à l'aide de la réaction de LOWRY [61] et en dosant les activités biologiques (activités ocytotique et vasopressique).

Nous avons effectué 5 chromatographies dans des conditions identiques et en utilisant des quantités croissantes de peptides actifs. La *figure 2* indique les résultats obtenus par une de ces chromatographies.

On observe deux pics bien séparés : la substance correspondant au premier pic est éluee entre 60 ml et 140 ml. Elle possède la quasi-totalité de l'activité ocytotique placée sur la colonne, alors que celle correspondant au second pic, éluee après la mise du second gradient (entre 200 ml et 250 ml), possède la quasi-totalité de l'activité vasopressique. Les tubes contenant chacune de ces substances sont rassemblés, concentrés sous vide dans un appareil rotatif et l'acétate d'ammonium est chassé par évaporation répétée à 40° en dessiccateur en présence de soude et d'acide sulfurique. L'examen du *Tableau VI* montre que les activités biologiques sont éluées avec des rendements allant de 62 % à 100 %.

Par cette technique, des quantités de 10 à 20 mg d'hormones purifiées peuvent être préparées. Néanmoins, en apportant quelques modifications, on peut conserver la même finesse de séparation pour des quantités supérieures d'hormones. Les conditions sont alors les suivantes : on utilise une colonne d'Amberlite IRC 50 forme H de 2×20 cm. La chambre de mélange est de 250 ml, les fractions collectées sont de 7 ml et la vitesse d'écoulement de la colonne est de 10 ml/heure. Le premier gradient étant appliqué, l'ocytocine est éluee entre 495 et 910 ml. Après 1.050 ml, on établit le second gradient et la vasopressine est éluee entre 1.190 et 1.750 ml.

Pour chacune de ces hormones, on remarque en outre que les courbes d'activité et de coloration avec la réaction de Lowry coïn-

(*) Les tampons sont préparés à partir de l'acide acétique et de l'ammoniaque ; leur molarité est exprimée en ammoniacque.

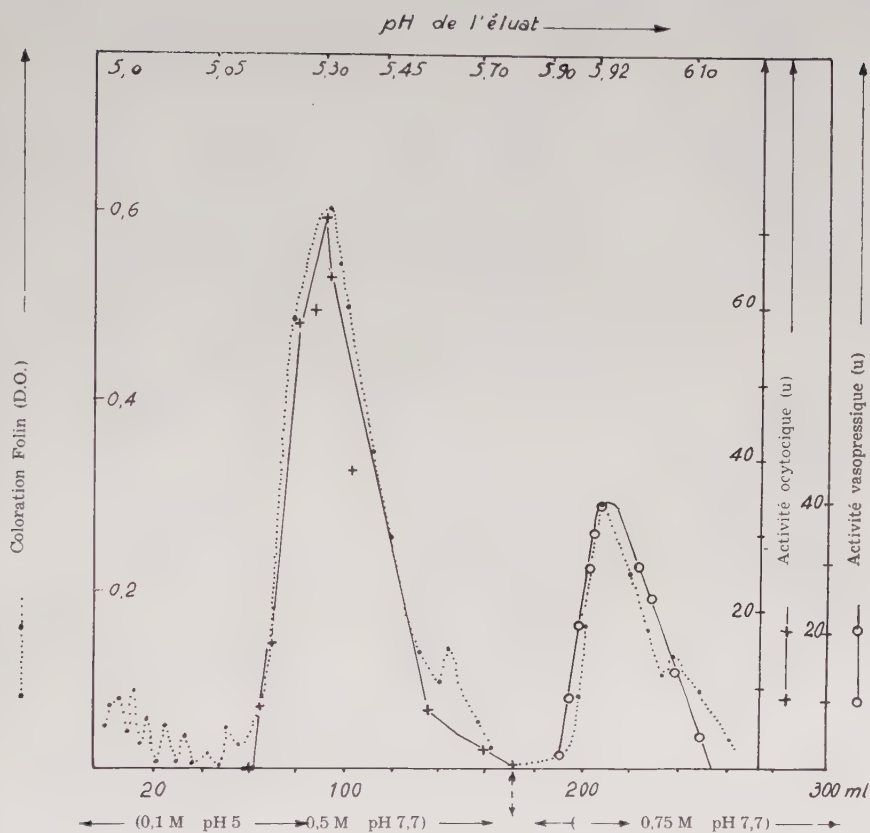


Figure 2 : Chromatographie de l'ocytocine et de la vasopressine de cheval sur Amberlite IRC 50

— Matériel : 3.200 u en activité ocytocique ; 2.400 u en activité vasopressique
 — Colonne : 0,9 × 10 cm — Mélangeur — 50 ml
 — Tampons : I Acétate d'ammonium pH 5 0,1 M
 II Gradient » » pH 7,7 0,5 M
 III » » » pH 7,7 0,75 M

Tableau VI

Chromatographies sur Amberlite IRC 50 (X.E.64) de l'ocytocine et de la vasopressine du cheval obtenues après dissociation du complexe actif

Chromatographie	Activité ocytocique			Activité vasopressique		
	Activité soumise à la chromatographie (en u)	Activité recueillie		Activité soumise à la chromatographie (en u)	Activité recueillie	
		en u	en % de l'activité initiale		en u	en % de l'activité initiale
1	650	400	62	490	300	62
2	3.200	3.200	100	2.400	1.490	62
3	4.000	3.480	87	2.100	1.980	94
4	9.700	8.400	87	4.800	4.400	92
5	11.500	12.000	100	9.700	9.700	100

cident ; ceci peut constituer un premier critère de pureté. L'électrophorèse sur papier à différents pH et la chromatographie sur papier ont confirmé ce résultat. La composition chimique et la structure des deux hormones peuvent alors être envisagées (cf. *Chapitre III*).

B) ISOLEMENT DES HORMONES DU MOUTON

La posthypophyse du mouton est beaucoup plus petite que celle du cheval ou du bœuf (10 à 15 fois). Moins individualisée, elle est plus difficile à séparer du lobe antérieur et des risques de contaminations sont possibles. Le traitement des glandes est le même que celui décrit dans le cas des post-hypophyses de cheval. Le poids moyen d'une posthypophyse séchée est de 10 mg.

La poudre acétonique posthypophysaire utilisée au cours de ce travail possède les activités suivantes :

- 0,8 u/mg en activité ocytotique ;
- 1,0 u/mg en activité vasopressive.

Les activités biologiques sont donc voisines de celles trouvées pour les poudres acétoniques posthypophysaires du bœuf ou du cheval.

Sur un lot unique de 50 g, deux préparations de complexe actif ont été effectuées*.

1) Préparation du complexe actif.

La première préparation obtenue à partir de 20 g de poudre acétonique est identique à celle réalisée pour le cheval ; la seconde, à partir de 30 g, est faite en apportant une légère modification à la précipitation fractionnée au moyen du chlorure de sodium. Dans ces conditions, le rendement pondéral en complexe actif est fortement amélioré.

30 g de poudre posthypophysaire sont extraits vingt-quatre heures par 1 litre d'acide sulfurique 0,01 N sous agitation, en chambre froide, puis après centrifugation, par 0,5 litre pendant neuf heures. Le pH de l'extrait (pH 4,75) est ajusté à 3,9 par 3 ml d'acide sulfurique normal et le complexe actif est précipité par addition de chlorure de sodium à raison de 10 g pour 100 ml. Après vingt-quatre

(*) Nous sommes heureux de remercier les Etablissements CHOAY qui ont assuré la collecte et le traitement des glandes.

heures, le précipité centrifugé, mis en suspension dans 250 ml d'eau distillée, est dialysé jusqu'à élimination totale des chlorures. Il est ensuite mis en solution dans 1,4 litre de tampon acétate de sodium 0,5 M pH 3,9. On effectue alors une précipitation fractionnée au moyen de chlorure de sodium en recueillant la fraction précipitant entre 1 et 6,5 g pour 100 ml. Après quinze heures, le précipité est redissous dans 250 ml de tampon acétate de sodium 0,5 M pH 3,9 et le complexe actif est à nouveau précipité par addition de chlorure de sodium (6,5 g pour 100). Dans un volume de 200 ml de tampon, on répète trois fois cette précipitation, puis le produit final mis en suspension dans 100 ml d'eau distillée est dialysé contre l'eau puis lyophilisé.

On obtient ainsi 1,26 g d'une poudre titrant 18 unités en activité vasopressive ou ocytocique au milligramme (*Tableau VII*). Ceci correspond à 4,2 g de complexe actif pour 100 g de poudre acétonique initiale. La première préparation effectuée dans les mêmes conditions que celle du cheval donnait 1,8 g pour 100 g de cette même poudre acétonique.

En ce qui concerne le rendement des activités biologiques, celui-ci est exceptionnellement bon dans le cas du mouton : le complexe actif représente 80 % des activités initiales. Le *Tableau VIII* indique les rendements en complexe actif obtenus à partir de poudres acétoniques de posthypophyses de quatre espèces de mammifères. On constate que si les poudres acétoniques ont des activités toutes voisines (1 u/mg), les rendements en complexe actif varient d'un tissu à l'autre. Ceci est probablement dû aux différences de solubilité des neurophysines, car cette solubilité conditionne la précipitation du complexe. Les activités spécifiques des différents complexes sont du même ordre.

2) Élimination de la protéine support.

a) PRÉCIPITATION PAR L'ACIDE TRICHLORACÉTIQUE A 5 % :

Trois dissociations ont été réalisées, chacune à partir de 300 mg de complexe actif de mouton.

300 mg de complexe actif sont mis en solution dans 40 ml d'acide acétique 0,25 %. On ajoute 2 ml d'acide trichloracétique 100 p. 100 (P/V) et on agite à 0° pendant dix minutes. Après une centrifugation rapide, le culot est repris par 40 ml d'acide acétique 0,25 % et une deuxième précipitation est effectuée. Le précipité est alors mis en suspension dans l'eau distillée et dialysé pour éliminer l'acide trichloracétique. Le dialysé a un pH de 4,7 et après lyophilisation

Tableau VII

Préparation du complexe actif du mouton

	Poids (g)	Activité ocytocique		Activité vasopressique	
		en u	en % de l'activité initiale	en u	en % de l'activité initiale
Matériel extrait par l'acide sulfurique 0,01 N	3,8	27.400	100	30.000	100
Précipitation chlorure de sodium 10 %	2,2	24.500	89	28.000	84
Précipitation chlorure de sodium 1 % à 6,5 %	1,5	22.500	82	25.000	83
6ème précipitation chlorure de sodium 6,5 %	1,3	22.000	80	22.000	73

(Préparation n° II : 30 g de poudre acétonique post-hypophysaire)

Tableau VIII

Comparaison des complexes actifs
de différentes espèces de mammifères

Espèce	*Complexe actif (g)	Activité ocytocique (u/mg)	Activité vasopressique (u/mg)
Boeuf	1,5	18	18
Porc	1,5	18	18
Cheval	0,8	20	10
Mouton	4,2	18	18

(*) Rendement en complexe actif pour 100 de poudre acétonique post-hypophysaire.

on récupère la neurophysine avec un rendement de 75 %. Les solutions surnageantes sont passées sur colonne d'Amberlite IR 45 forme acétate (2,5 × 15 cm) pour être débarrassées de l'acide trichloracétique. Après lavage de la colonne à l'eau distillée, le filtrat (120 ml) a un pH de 3,0 à 3,6 suivant les essais. Il représente en outre 80 à 98 % des activités biologiques du complexe actif (*Tableau IX*).

Par ionophorèse sur papier Whatman n° 1 (pH 3,55 tampon acétate de pyridine, 6 heures, 10 v/cm), l'examen de ce filtrat indique la présence de deux substances peptidiques, révélables au bleu de bromophénol et au réactif de Gerngross (tyrosine) [62]. Les cheminement de ces deux substances sont comparables à ceux obtenus pour les peptides de cheval.

Tableau IX

Activités ocytotique et vasopressique recueillies dans la solution surnageante après précipitation de la protéine support de mouton par l'acide trichloracétique à 5 %

Quantité du complexe (mg)	Activité ocytotique		Activité vasopressique	
	en u	en % de la quantité initiale	en u	en % de la quantité initiale
300	4.200	80	5.000	98
300	4.800	92	4.800	92
300	4.800	92	4.300	83

b) ESSAI DE RECONSTITUTION DU COMPLEXE HORMONAL :

Le complexe actif peut être dissocié en trois constituants : une protéine (la neurophysine) et deux peptides possédant respectivement l'activité ocytotique et l'activité vasopressique. La reconstitution du complexe à partir de ses éléments a été réalisée.

Dans le cas du mouton, les conditions sont les suivantes : on utilise une solution (2,4 ml) contenant 25 unités de vasopressine et 20 unités d'ocytocine par ml. Le pH est ramené à 3,9 par de la soude 0,1 N et le volume est ajusté à 3 ml par du tampon acétate de sodium M, pH 3,9. On dissout ensuite la neurophysine de précipitation à raison de 1 mg/ml : les proportions des activités vasopres-

sique et ocytocique sont alors respectivement de 20 unités et 17 unités/mg de protéine. Après un contact d'une heure, on ajoute 100 mg de chlorure de sodium par ml et on laisse la précipitation s'effectuer pendant onze heures à 0°C. 80 à 90 % des activités se retrouvent dans le précipité. Celui-ci est séparé par centrifugation et dialysé contre l'eau pendant une nuit pour éliminer le sel. On constate alors que 75 à 80 % des activités initiales ont été fixées par la protéine précipitée et ne sont pas dialysables. Le complexe ainsi reformé possède une activité vasopressique de 15 u/mg et une activité ocytocique de 13 u/mg, alors que le complexe initial titrait 18 u/mg de chaque hormone.

Dans des conditions identiques, un complexe actif constitué par la neurophysine de cheval d'une part, l'ocytocine et la vasopressine de mouton d'autre part, a pu être obtenu. Ce complexe possède une activité ocytocique de 18 u/mg et une activité vasopressique de 11 u/mg, soit pratiquement les activités spécifiques du complexe de cheval.

Ces deux expériences montrent qu'il est possible, non seulement de reconstituer le complexe actif à partir de ses éléments, mais encore de réaliser des associations interspécifiques entre hormones et neurophysines d'origine différente.

3) Séparation de l'ocytocine et de la vasopressine.

A partir des solutions surnageantes obtenues après précipitation de la neurophysine par l'acide trichloracétique à 5 %, trois chromatographies sur Amberlite IRC 50 ont été effectuées dans les mêmes conditions que celles décrites pour la séparation des hormones du cheval.

Après adsorption de la fraction contenant les peptides actifs et équilibration de la colonne à pH 5 par passage de 70 ml de tampon acétate d'ammonium pH 5,0, 0,1 M, on élue l'ocytocine par un gradient obtenu avec le tampon acétate d'ammonium pH 7,7, 0,5 M ; puis après 170 ml, on établit un gradient par le tampon acétate d'ammonium pH 7,7, 0,75 M, de façon à obtenir l'élution de la vasopressine.

La *figure 3* indique les résultats obtenus. Comme pour les hormones du bœuf et du cheval, deux pics distincts sont observés. L'un, situé entre 50 ml et 140 ml, possède la totalité de l'activité ocytocique récupérable et a une position très voisine de celle de l'ocytocine du cheval ; l'autre possède la totalité de l'activité vasopressique. Il est élué entre 200 et 280 ml, soit au même niveau que la vasopressine

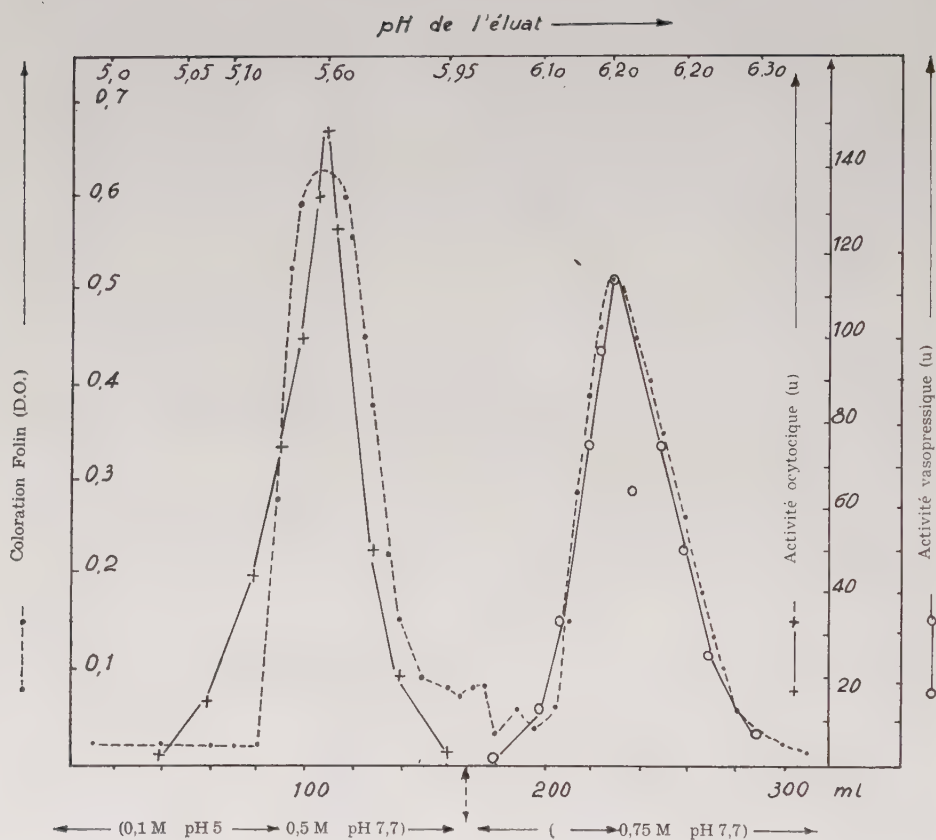


Figure 3 : Chromatographie de l'ocytocine et de la vasopressine de mouton sur Amberlite IRC 50

- Matériel: 4.800 u en activité ocytocique: 4.300 u en activité vasopressique
- Colonne: 0,9 × 10 cm. Mélangeur 50 ml
- Tampons: I Acétate d'ammonium pH 5 0,1 M
- II Gradient » » pH 7,7 0,5 M
- III » » » pH 7,7 0,75 M

Tableau X

Chromatographies sur Amberlite IRC 50 (X.E. 64) de l'ocytocine et de la vasopressine du mouton obtenues après dissociation du complexe neurophysine-peptides

Chromatographie	Activité ocytocique			Activité vasopressique		
	Activité soumise à la chromatographie (en u)	Activité recueillie		Activité soumise à la chromatographie (en u)	Activité recueillie	
		en u	en % de l'activité initiale		en u	en % de l'activité initiale
1	4.200	3.500	83	5.000	4.000	80
2	4.800	4.500	94	4.800	2.100	44
3	4.800	3.800	79	4.300	3.800	88

du cheval. Les tubes correspondant à chacune des activités biologiques sont rassemblés puis concentrés. L'acétate d'ammonium est éliminé par sublimation. L'examen du *Tableau X* montre que 80 à 90 % des activités biologiques adsorbées sur la colonne sont récupérées.

Les courbes d'activité et de coloration avec le réactif de Lowry coïncident. Ceci peut être interprété comme un premier indice de pureté pour les deux hormones isolées. D'autre part, soumis à des ionophorèses à différents pH et à des chromatographies sur papier dans différents solvants, ces deux peptides actifs se révèlent homogènes. L'étude de leur composition en acides aminés et de leur structure peut alors être entreprise (cf. *Chapitre III*).

C) ISOLEMENT DES HORMONES DE LA BALEINE A NAGEOIRE

Les cétacés qui comprennent les plus gros mammifères marins se divisent en deux groupes principaux :

- 1) Les baleines à fanons, d'une part, dont les espèces pêchées sont :
 - la baleine bleue (Blue Whale : *Balaenoptera musculus*);
 - la baleine à nageoire (Finback Whale : *Balaenoptera physalus*);
- 2) et les baleines à dents ou cachalots d'autre part, dont le cachalot macrocéphale (Sperm Whale : *Physeter megalocephalus*) est le type courant.

Les baleines à fanons sont de taille et de poids très variables. La baleine bleue peut mesurer jusqu'à 30 m de long et peser une centaine de tonnes. A l'heure actuelle, elle n'est pratiquement plus pêchée. Par contre, la baleine à nageoire, qui mesure une vingtaine de mètres, fait l'objet de pêches actives dans l'Antarctique.

Comparativement à leur poids, les hypophyses de ces animaux sont petites et pèsent en moyenne, à l'état frais, de 15 à 20 g. La posthypophyse est très nettement différenciée et particulièrement bien séparée du lobe antérieur, mais ne représente qu'une faible partie de la glande (le vingtième). Chaque espèce se signale par un rapport différent des activités vasopressique et ocytotique [63, 64].

La baleine bleue possède un rapport des deux activités semblable à celui des autres groupes de mammifères, mais les deux autres espèces présentent une déficience plus ou moins grande en activité ocytotique.

Espèces	Activité vasopressique	Activité ocytotique	Rapport V/O
Baleine bleue	1,53	1,9	0,8
Baleine à nageoire	1	0,4	2,5
Cachalot macrocéphale	1	0,08	12,5

Les Etablissements Salvesen (Leith) ont bien voulu prélever spécialement pour nous les posthypophyses des baleines pêchées au cours de la saison 1958-1959, soit 110 posthypophyses de baleine à nageoire (Finback Whale : *Balaenoptera physalus*). Les posthypophyses ont été prélevées sur le bateau-usine et aussitôt plongées dans l'acétone. Reçues dans l'acétone au laboratoire, ces glandes ont fourni 18 g de matière sèche, la poudre obtenue après traitement à l'omnimixer, titre :

- 0,5 u/mg en activité ocytotique ;
- 2,5 u/mg en activité vasopressique ;

soit un rapport v/o = 5.

1) Préparation du complexe actif.

Une première préparation a été effectuée sur 3 g de poudre acétonique en suivant un schéma de purification voisin de celui utilisé pour les deux autres mammifères : le cheval et le mouton, précédemment étudiés. Après extraction par l'acide sulfurique dilué, on obtient l'activité vasopressique avec un rendement de 84 %, mais l'activité ocytotique n'est que partiellement extraite (42 %). Etant donné la faible activité ocytotique de la poudre acétonique initiale, il convenait de modifier la préparation afin d'améliorer les rendements en activité ocytotique. Un traitement préalable de la poudre acétonique a été envisagé :

3 g de poudre acétonique posthypophysaire sont agités avec 150 ml d'éther (anhydre et sans peroxyde). Après centrifugation, le culot est repris et lavé une nouvelle fois à l'éther. On sèche en dessiccateur sous vide, puis la poudre dégraissée est plus finement déchiquetée.

Les activités biologiques sont extraites avec un volume d'acide sulfurique 0,01 N double de celui employé pour les autres espèces de mammifères, l'extraction n'étant complète que dans ces conditions : 3 g de poudre traitée à l'éther sont malaxés et mis en contact avec 180 ml d'acide sulfurique 0,01 N pendant vingt-quatre heures. Après centrifugation, le culot est remis en suspension avec 90 ml d'acide sulfurique 0,01 N et laissé à nouveau vingt-quatre heures à 0°. L'extrait obtenu (pH 3,9) est soumis à une extraction par de l'éther saturé d'eau. On effectue ensuite une précipitation au chlorure de sodium à 10 g pour 100 ml. Le précipité recueilli (vingt heures après) est dialysé dans un volume de 10 ml d'eau distillée. Après élimination totale des chlorures, le dialysé est mis en solution dans 60 ml d'eau distillée et le volume est porté à 120 ml par du tampon acétate de sodium molaire pH 3,9. Pour éviter une perte trop importante de complexe actif, on recueille la fraction précipitant entre 0,5 et 6,5 g p. 100 en chlorure de sodium. Le précipité à 6,5 g p. 100 est mis en suspension dans 6 ml d'eau distillée. On ajoute 6 ml de tampon acétate de sodium molaire pH 3,9 et on précipite 4 fois dans les mêmes conditions par addition de chlorure de sodium (6,5 g p. 100). Le précipité final est mis en suspension dans 15 ml d'eau distillée et dialysé contre l'eau jusqu'à élimination totale des chlorures.

Le *Tableau XI* montre que le traitement à l'éther de la poudre acétonique et de l'extrait sulfurique améliore l'extraction de l'activité ocytotique (préparation II). Dans ces conditions seulement, la précipitation du complexe actif est réalisée comme chez les autres mammifères précédemment étudiés.

2) Élimination de la protéine support.

La dissociation du complexe actif est effectuée par précipitation de la protéine support à l'aide de l'acide trichloracétique à 5 %.

Le précipité dialysé précédemment obtenu est ajusté à un volume de 90 ml et à une concentration en acide acétique de 0,25 %. On ajoute alors 4,5 ml d'acide trichloracétique 100 % (P/V) et après dix minutes d'agitation à 0°, la suspension est rapidement centrifugée. Le culot est remis en solution dans le même volume d'acide acétique 0,25 % et on effectue une seconde précipitation dans des conditions

Tableau XI

Préparation du complexe actif de la baleine à nageoire
(Préparation = 3 g de poudre acétonique post-hypophysaire)

	P R E P A R A T I O N I				* P R E P A R A T I O N II			
	Poids (g)	Activité ocytocique		Activité vasopressique	Poids (g)	Activité ocytocique		Activité vasopressique
		en u	en %			en u	en %	
Matériel extrait par l'acide sulfurique 0,01 N	0,38	630	42	6.300 84	0,50	1.500	100	5.900 78
1ère précipitation par chlorure de sodium 10 %	0,20	480	32	4.800 64	0,23	1.300	87	4.850 64
2ème précipitation par chlorure de sodium 0,5 à 6,5 %	0,12	370	25	3.300 44	0,20	1.070	71	3.940 53
6ème précipitation par chlorure de sodium 6,5 %	0,09	300	20	3.000 40	0,18	855	57	3.550 47

(*) La poudre acétonique a été
préalablement traitée à l'éther
anhydre.

identiques. La protéine précipitée est éliminée, dialysée contre de l'eau, puis lyophilisée (104 mg). Les deux solutions surnageantes sont placées sur une colonne d'Amberlite IR 45 pour être débarrassées de l'acide trichloracétique, on lave ensuite avec 100 ml d'eau distillée. Le filtrat obtenu est concentré à 150 ml.

Le rendement de la dissociation (*Tableau XII*) est de 50 % en activité vasopressique et de 58 % en activité ocytocique. En ce qui concerne le rendement en activité ocytocique, il est nettement amélioré par rapport à celui obtenu (16 %) au cours d'une préparation effectuée dans les conditions habituelles, c'est-à-dire sans traitement préalable à l'éther de la poudre acétonique.

Tableau XII

Purification de l'ocytocine et de la vasopressine de la baleine à nageoire

O P E R A T I O N	Activité ocytocique		Activité vasopressique	
	Rendement de l'opération (en %)	Rendement général (en %)	Rendement de l'opération (en %)	Rendement général (en %)
I - Extraction par l'acide sulfurique 0,01 N	100	100	78	78
II - Complexe actif	57	57	60	47
III - Elimination de la protéine support	58	33	50	23
IV - Chromatographie (Amberlite IRC 50)	42	14	82	19

(Préparation n° II: 3 g de poudre acétonique traitée à l'éther)

3) Séparation de l'ocytocine et de la vasopressine.

Après dissociation du complexe actif, la séparation des deux hormones est réalisée comme pour les autres mammifères par chromatographie sur Amberlite IRC 50 forme H (0,9 × 10 cm).

Les peptides sont adsorbés sur l'Amberlite, puis la colonne est équilibrée à pH 5 à l'aide d'un tampon acétate d'ammonium pH 0,5, 0,1 M (55 ml). On élue l'activité ocytocique au moyen d'un gradient

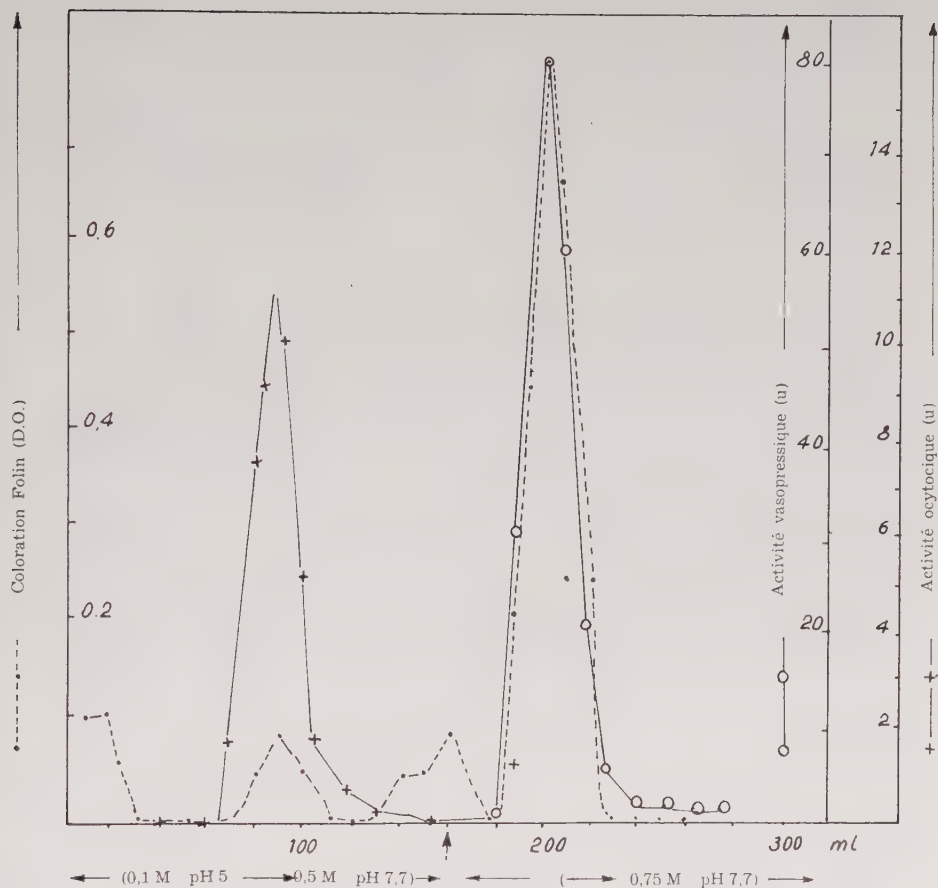


Figure 4 : Chromatographie de l'ocytocine et de la vasopressine de baleine sur Amberlite IRC 50

- Matériel : 500 u en activité ocytocique ; 2.000 u en activité vasopressique
- Colonne : 0,9 X 10 cm — Mélangeur — 50 ml
- Tampons : I Acétate d'ammonium pH 5 0,1 M
- II Gradient » » pH 7,7 0,5 M
- III » » » pH 7,7 0,75 M

de pH et de force ionique établi par un tampon acétate d'ammonium pH 7,7, 0,5 M. Après 160 ml, un second gradient établi par le tampon acétate d'ammonium pH 7,7, 0,75 M permet l'élution de l'activité vasopressique.

On obtient (*fig. 4*) deux pics nettement séparés. Le premier pic élué de 70 à 120 ml est très aigu et symétrique ; il possède toute l'activité ocytotique récupérable. Le second pic élué de 180 à 240 ml possède toute l'activité vasopressique. On constate que l'emplacement des pics est sensiblement identique à celui trouvé pour les peptides du cheval et du mouton.

La coïncidence des courbes d'activité avec celle donnée par la réaction de Lowry est le premier critère de pureté. Chaque produit concentré et débarrassé de l'acétate d'ammonium est soumis à une étude de composition et de structure (*cf. Chapitre III*).

Les hormones neurohypophysaires de trois espèces de mammifères ont donc été isolées. Ces hormones se révèlent être identiques à celles antérieurement décrites chez le bœuf [65, 66, 67, 68] ; il s'agit de l'ocytocine et de l'arginine-vasopressine. Ces deux hormones ont aussi été caractérisées chez l'homme par LIGHT et DU VIGNEAUD [69].

De tous les mammifères étudiés, différents par leur mode de vie (terrestre ou marin) et par leur régime (herbivore, omnivore), seul le porc possède une vasopressine différente de la vasopressine du bœuf : la lysine vasopressine a été isolée [70, 71, 72], le résidu d'arginine étant remplacé par un résidu de lysine. Cette substitution n'entraîne pas une disparition de l'activité vasopressique, mais sa diminution.

L'ocytocine et l'arginine-vasopressine sont donc les hormones neurohypophysaires les plus fréquentes chez les mammifères. Cependant les six espèces étudiées ne peuvent pas être considérées comme représentatives de toute la classe des mammifères qui comprend environ 7.000 espèces. L'étude des hormones chez des espèces de mammifères non domestiques est subordonnée à des problèmes de collecte de glandes et il nous a paru plus important d'explorer d'autres classes de vertébrés afin de déterminer les variations qu'a pu entraîner l'évolution.

CHAPITRE II

Isolement des hormones des oiseaux

Les oiseaux, après les mammifères, sont les vertébrés les plus évolués. Ils constituent une classe très homogène, se composant de familles qui possèdent les mêmes caractères anatomiques et physiologiques généraux. Ils comprennent cependant un grand nombre d'espèces. Ces animaux sont généralement de petite taille et l'hypophyse est beaucoup plus petite que dans le cas des mammifères courants. Dans ces conditions, un grand nombre de posthypophyses est nécessaire pour obtenir une quantité de poudre acétonique suffisante pour une étude chimique des principes actifs.

L'isolement des hormones neurohypophysaires a été tenté chez une des espèces les plus courantes : le poulet.

ISOLEMENT DES HORMONES DU POULET

Les têtes de poulet arrivent au laboratoire soit fraîches (vingt-quatre heures après la mort de l'animal), soit congelées (la mort remonte alors à une semaine)*. Elles sont immédiatement disséquées. Le prélèvement de l'hypophyse est effectué par la voie pharyngée et, malgré sa taille (environ 2,5 mg), la posthypophyse est totalement séparable du lobe antérieur bilobé. Aussitôt prélevées et séparées, les posthypophyses sont plongées dans de l'acétone refroidie et renouvelée trois fois en soixante-douze heures. Après ce traitement, les glandes sont séchées sous vide en dessiccateur jusqu'à poids constant.

(*) Nous remercions la Société Industrielle de Transformation de Produits Agricoles (Auxonne) et la Société Francpoulet, qui nous ont très aimablement fourni les têtes de poulet.

Les posthypophyses broyées à « l'omnimixer » fournissent une poudre acétonique qui titre au maximum :

- 0,4 u/mg en activité ocytotique ;
- 0,4 u/mg en activité vasopressique.

Le prélèvement de 3.000 posthypophyses de poulet permet d'obtenir 2 g de poudre acétonique : quatre préparations d'environ 2 g chacune ont été effectuées.

1) Préparation du complexe actif.

Des essais préliminaires ont montré qu'il est possible d'extraire les activités biologiques de la poudre posthypophysaire de poulet par l'acide sulfurique dilué. La précipitation du complexe actif par le chlorure de sodium à 10 % s'effectue mais avec un mauvais rendement soit que la neurophysine du poulet ait une solubilité particulière, soit qu'elle ait subi une dégradation, les glandes n'ayant pas toujours été prélevées dès la mort des animaux. La purification du complexe actif a été réalisée en augmentant la concentration en chlorure de sodium et en effectuant un apport de neurophysine de mammifères ou de neurophysine de poulet obtenue au cours de préparations antérieures. Il est ainsi possible, dans le cas du poulet, de constituer un complexe actif. Néanmoins, le rendement obtenu après dialyse montre que ce complexe est moins stable que celui obtenu avec les mammifères en général.

2 g de poudre acétonique sont extraits par de l'acide sulfurique 0,01 N (60 ml) ; après broyage au mortier et à l'omnimixer, on maintient la suspension vingt-quatre heures au froid, sous agitation magnétique. Après centrifugation, le culot d'extraction est repris par un même volume d'acide sulfurique 0,01 N et l'extraction est répétée dans les mêmes conditions. L'extrait total obtenu est concentré à 60 ml, on ajuste le pH (5,3) à 3,9 par quelques gouttes d'acide sulfurique normal et on ajoute ensuite 40 mg de neurophysine de poulet. Au bout d'une heure, on effectue une précipitation au moyen de chlorure de sodium 30 p. 100, on laisse pendant quinze heures à 5°. Le précipité centrifugé est mis en suspension dans 40 ml d'eau et une seconde précipitation au chlorure de sodium à 30 p. 100 est alors effectuée. Ce précipité est centrifugé cinq heures après puis dialysé ($v = 30$ ml) contre de l'eau renouvelée huit fois en quatre heures, afin d'éliminer rapidement et totalement le chlorure de sodium.

Le *Tableau XIII* indique les résultats obtenus : le rendement de l'extraction est de 75 à 85 %. Par contre, le deuxième précipité au moyen du chlorure de sodium (après dialyse) représente 30 à 36 % des deux activités initiales.

Tableau XIII

Purification de l'ocytocine et de la vasotocine du poulet

	Activité ocytocique		Activité vasopressique	
	en u	en % de la quantité initiale	en u	en % de la quantité initiale
Extraction par l'acide sulfurique 0,01 N	680	85	600	75
Précipitation par chlorure de sodium 30 %	290	36	230	29
Élimination de la protéine support	240	30	200	25
Chromatographie sur Amberlite IRC 50	220	28	165	20

(Préparation n° IV: 2 g de poudre acétonique post-hypophysaire)

2) Élimination de la protéine support.

La dissociation du complexe actif (neurophysine-peptides) est effectuée comme chez les mammifères par précipitation à l'aide de l'acide trichloracétique à 5 %.

Le dialysé est acidifié avec de l'acide acétique (volume final : 30 ml d'acide acétique à 0,25 %) et on ajoute ensuite 1,5 ml d'acide trichloracétique 100 p. 100 (p/v). La suspension est agitée dix minutes à 0°, puis centrifugée. Le culot est repris par 30 ml d'acide acétique 0,25 % et on effectue une nouvelle précipitation. Le précipité est éliminé et dialysé. Après lyophilisation, on obtient 80 mg de « neurophysine » de poulet. Les deux solutions surnageantes sont immédiatement passées sur une colonne d'Amberlite IR 45 forme acétate (2 × 20 cm). Après lavage de la colonne, on recueille un filtrat à pH 4,2. Il représente 70 % de l'activité ocytocique et 80 % de l'activité vasopressique du complexe actif initial (cf. *Tableau XIII*).

3) Isolement de la vasotocine.

Les solutions renfermant les peptides actifs, obtenues après élimination de la protéine support, sont concentrées à 75 ml, puis adsorbées sur une colonne d'Amberlite IRC 50, forme H ($0,9 \times 10$ cm). Les conditions de chromatographie sont rigoureusement identiques à celles précédemment utilisées pour l'isolement des hormones de mammifères.

La colonne est équilibrée à pH 5 par passage de 45 ml de tampon acétate d'ammonium pH 5, 0,1 M. On établit alors un gradient à l'aide d'un tampon acétate d'ammonium pH 7,7, 0,5 M, puis après élution de 160 ml, on augmente la force ionique du gradient (tampon acétate d'ammonium pH 7,7, 0,75 M). La présence des peptides actifs est déterminée en dosant les activités biologiques (ocytocique et vasopressique).

Deux pics possédant une activité ocytocique sont obtenus (fig. 5).

Le premier pic est élué dans la fraction comprise entre 80 et 120 ml, le second apparaît entre 150 et 200 ml. Le premier pic occupe une position très voisine de celle de l'ocytocine des mammifères. Le second présente deux particularités : d'une part, il possède une activité vasopressique prépondérante ; d'autre part, il est situé dans ce diagramme, à une place différente de l'arginine vasopressine, qui dans des conditions identiques serait éluée entre 200 et 250 ml. Ces caractéristiques biologiques et chromatographiques semblent signaler la présence d'un peptide actif nouveau.

Le *Tableau XIV* indique les rendements des activités biologiques obtenues : 50 % de l'activité ocytocique placée sur la colonne est retrouvée dans le premier pic et 36 % dans le second. L'activité vasopressique du second pic rend compte de 70 % de l'activité vasopressique initiale.

Le microdosage de Lowry permet de connaître la répartition du matériel peptidique. La courbe obtenue est différente d'un essai à l'autre, l'importance des contaminants variant avec l'origine des lots en fonction probablement du degré d'autolyse. Néanmoins, il est parfois possible d'obtenir deux fractions très faiblement souillées.

Lorsqu'une purification supplémentaire est nécessaire, elle est effectuée par une combinaison électrophorèse-chromatographie sur papier. Les conditions sont les suivantes : après élimination rapide de l'acétate d'ammonium par sublimation, une quantité de peptide (seconde fraction) correspondant à 10 u en activité vasopressique et 5 u en activité ocytocique, est soumise à une électrophorèse dans du toluène,

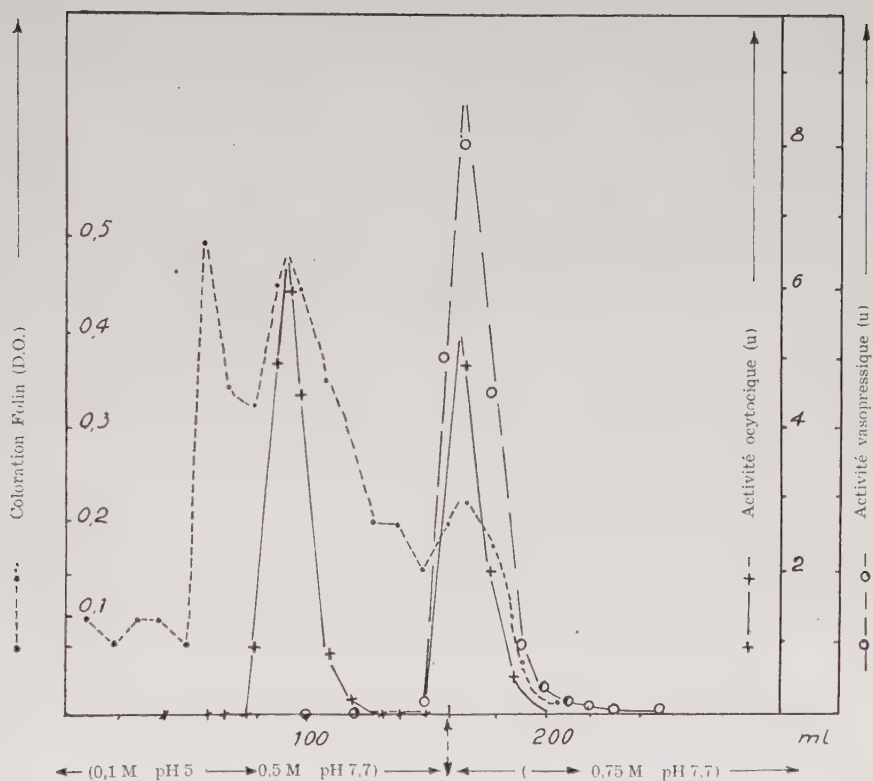


Figure 5 : Chromatographie des hormones neurohypophysaires du poulet sur Amberlite IRC 50

- Matériel: 240 u en activité ocytocyque ; 200 u en activité vasopressique
- Colonne: 0,9 × 10 cm — Mélangeur — 50 ml
- Tampons: I Acétate d'ammonium pH 5 0,1 M
- II Gradient » » pH 7,7 0,5 M
- III » » » pH 7,7 0,75 M

sur papier Whatman n° 1 à pH 6,5 acétate de pyridine 0,06 M, pendant une heure à 1.600 V. La révélation à la ninhydrine et au réactif de Sakaguchi permet de détecter plusieurs substances peptidiques, mais une seule réagit à la fois à la ninhydrine (coloration jaune) et au réactif de Sakaguchi. L'élution de cette substance après une électrophorèse préparative, effectuée dans des conditions identiques, permet de récupérer 50 % des activités ocytocique et vasopressique initiales. L'éluat obtenu est concentré, puis soumis à une chromatographie préparative sur papier, l'éluat correspondant aux deux activités possède le même Rf que la substance révélée à la fois au réactif de Sakaguchi (arginine) et de Gerngross (tyrosine). Le peptide obtenu peut être soumis à l'analyse chimique (cf. *Chapitre III*).

Tableau XIV

Isolement de la vasotocine du poulet par chromatographie sur Amberlite IRC 50 après dissociation du complexe actif

Fractions éluées par chromatographie	Activité ocytocique		Activité vasopressique	
	en u	en % de la quantité placée sur la colonne	en u	en % de la quantité placée sur la colonne
Première fraction éluee entre 80 ml << 120 ml	130	52	-	-
Seconde fraction éluee entre 150 ml << 200 ml (Vasotocine)	90	36	165	71

Deux hormones neurohypophysaires sont mises en évidence chez le poulet : une hormone probablement du même type que l'ocytocine, et une hormone nouvelle possédant les deux activités ocytocique et vasopressique. L'étude de la structure a révélé que cette hormone est identique à un peptide synthétique, préparé par DU VIGNEAUD et ses collaborateurs [73] et nommé « vasotocine » en raison de ses caractéristiques chimiques et biologiques. Cette appellation nous a paru convenable et nous l'avons adoptée pour le produit naturel.

Nous sommes donc en présence d'une variation très importante chez les oiseaux. L'arginine-vasopressine semble absente ou peu abondante et une nouvelle hormone neurohypophysaire est isolée. Il conviendrait néanmoins d'étendre cette étude à quelques autres espèces pour déterminer si des modifications particulières apparaissent dans cette classe de vertébrés.

CHAPITRE III

Isolément des hormones des batraciens

Après l'étude des hormones neurohypophysaires du poulet, il a paru intéressant d'étudier les principes actifs des vertébrés inférieurs chez lesquels la régulation du métabolisme hydrominéral pose des problèmes différents de ceux des mammifères et des oiseaux.

L'existence d'un facteur nouveau chez les vertébrés à sang froid a été suggérée par PICKERING et HELLER [74], SAWYER et al. [75], et MAETZ et al. [76] sur la base des données pharmacologiques. Il convenait donc d'essayer de caractériser les hormones neurohypophysaires d'une espèce de batracien et de déterminer si elles étaient voisines de celles des oiseaux. La grenouille a été choisie pour cette étude.

ISOLEMENT DES HORMONES DE GRENOUILLE

Les posthypophyses de grenouille (*Rana esculenta*) sont de taille très réduite (100 fois plus petites que celles de mouton), mais elles sont cependant séparables du lobe antérieur. Prélevées dès la mort de l'animal, ces posthypophyses sont plongées dans de l'acétone refroidie, puis envoyées* au laboratoire. Elles sont alors séchées sous vide jusqu'à poids constant.

10.000 glandes fournissent 1 g de poudre acétonique posthypophysaire. Les activités ocytotique et vasopressique des différents lots de poudre acétonique obtenus sont comprises entre 0,4 u/mg et

(*) Ce travail a été effectué en collaboration avec le Professeur MOREL et le Service de Biologie du Commissariat à l'Energie Atomique.

1 u/mg (*Tableau XV*). Les teneurs en activités biologiques sont variables suivant la conservation, la saison et la qualité du prélèvement.

Tableau XV

Activités de différents lots de poudre acétonique post-hypophysaire de grenouille (*Rana esculenta*)

PREPARATION	Activité ocytotique (u/mg)	Activité vasopressique (u/mg)
I	1,2	1,0
II	0,8	0,8
III	0,5	0,5
IV	0,4	0,4

Quatre préparations ont pu être réalisées, sur 1 ou 2 g de poudre acétonique.

1) Préparation du complexe actif.

Les activités biologiques de la poudre posthypophysaire de grenouille peuvent être extraites par de l'acide sulfurique 0,01 N. Cependant la préparation du complexe actif au moyen du chlorure de sodium 10 p. 100 s'effectue avec un mauvais rendement comme dans le cas des préparations de poulet.

La préparation du complexe actif est réalisée soit en effectuant un apport de neurophysine de mammifère ou de grenouille, soit en effectuant la précipitation à l'aide de chlorure de sodium à 30 p. 100.

1 g de poudre acétonique est trituré au mortier avec 50 ml d'acide sulfurique 0,01 N, puis laissé à 0° sous agitation pendant vingt-quatre heures. Le culot obtenu après centrifugation est remis en suspension dans un même volume d'acide et à nouveau laissé au froid pendant le même temps. L'extrait obtenu possède un pH de 4,9 à 6,0 suivant les essais: il représente 50 à 100 % des activités biologiques initiales (*Tableau XVI*).

Tableau XVI

Préparations du complexe actif de la grenouille

	PREPARATION II						PREPARATION III						PREPARATION IV					
	Activité ocytocique			Activité vasopressique			Activité ocytocique			Activité vasopressique			Activité ocytocique			Activité vasopressique		
	en u	en %		en u	en %		en u	en %		en u	en %		en u	en %		en u	en %	
I - Poudre acétonique	800	100		800	100		1.000	100		1.000	100		400	100		400	100	
II - Extraction par l'acide sulfurique 0,01 N	850	100		570	76		750	75		500	50		400	100		400	100	
III - Complexe actif	750	93		500	62		350	35		300	30		340	85		340	85	

Le pH étant ajusté à 3,9 par quelques gouttes d'acide sulfurique normal, on effectue soit une précipitation au moyen de chlorure de sodium 10 p. 100, si on a préalablement ajouté dans l'extrait sulfurique une neurophysine de mouton (préparation I ou II) ou une neurophysine de grenouille (préparation IV), soit une précipitation à l'aide de chlorure de sodium 30 p. 100 si l'extrait sulfurique est laissé intact (préparation III).

Le *Tableau XVI* indique les résultats obtenus : les rendements en complexe actif sont différents suivant les essais. Dans le cas où un apport de neurophysine a été effectué, on retrouve 60 à 90 % des activités biologiques initiales sous forme de complexe actif. Dans le cas où une précipitation au moyen de chlorure de sodium 30 p. 100 a été effectuée, on ne retrouve que 30 à 35 % des activités biologiques initiales ; l'addition de neurophysine augmente ici la stabilité du complexe actif, elle permet de réaliser une seconde précipitation du complexe à l'aide de chlorure de sodium 6,5 p. 100.

2) Elimination de la protéine support.

L'élimination de la protéine support est obtenue par précipitation à l'aide de l'acide trichloracétique à 5 p. 100.

Le précipité dialysé est ajusté à 30 ml par de l'eau et on ajoute de l'acide acétique concentré de façon à avoir une concentration en acide de 0,25 %. On effectue alors, suivant la technique habituelle,

Tableau XVII

Activités ocytotique et vasopressique recueillies dans la solution surnageante après précipitation par l'acide trichloracétique à 5 % de la protéine support de grenouille

	Activité ocytotique		Activité vasopressique	
	en u	en % de la quantité soumise à la précipitation	en u	en % de la quantité soumise à la précipitation
Préparation II	360	48	360	72
Préparation III	200	57	150	50
Préparation IV	200	58	200	58

deux précipitations successives par addition de 1,5 ml d'acide trichloracétique 100 p. 100 (P/V), et on centrifuge après avoir agité dix minutes à 0°. Les deux liquides surnageants sont passés sur une colonne d'Amberlite IR 45 (1,5 × 20), forme acétate, et on recueille un filtrat qui, après lavage de la colonne à l'eau distillée, a un volume de 100 ml et un pH de 3,5.

A cette étape de la purification, les rendements des activités biologiques des trois préparations sont de 50 à 58 % (*Tableau XVII*).

3) Mise en évidence de deux hormones à activité ocytotique. Isolement de la vasotocine.

La séparation des hormones est réalisée sur Amberlite IRC 50, forme H, dans des conditions identiques à celles utilisées pour les autres espèces de vertébrés.

Après précipitation par l'acide trichloracétique à 5 % de la neurophysine, les peptides actifs sont adsorbés sur une colonne d'Amberlite (0,9 × 10 cm). L'équilibration à pH 5,0 est obtenue par 50 ml de tampon acétate d'ammonium pH 5,0, 0,1 M. On établit le premier gradient de pH et de force ionique par le tampon acétate d'ammonium pH 7,7, 0,5 M. Après passage de 165 ml, on applique le second gradient (tampon acétate d'ammonium pH 7,7, 0,75 M). On détermine l'emplacement du matériel peptidique par la microréaction de Lowry et la sortie des pics actifs est détectée par le dosage des activités ocytotique, vasopressique et natriférique.

On constate la sortie de deux substances à activité ocytotique (*fig. 6*). La première substance est éluée entre 70 et 140 ml à une place très voisine de celle de l'ocytocine et représente 70 % de l'activité initiale. Le second pic à activité ocytotique est élué entre 170 et 220 ml et rend compte de 30 % de l'activité ocytotique initiale (*Tableau XVIII*). Il possède en outre une forte activité vasopressique et 70 à 100 % de l'activité vasopressique placée sur la colonne se retrouvent dans ce pic. Cette deuxième substance possède donc les mêmes caractéristiques que la vasotocine isolée chez le poulet.

D'autre part, le dosage d'activité natriférique indique la présence de deux pics. L'un se situe à une place voisine du premier pic à activité ocytotique. Le second se place exactement au niveau du deuxième pic à activité ocytotique et vasopressique et coïncide parfaitement. Une nouvelle activité biologique de la vasotocine est donc mise en évidence.

Les deux premières préparations ont permis d'obtenir une substance homogène correspondant au second pic de la chromatographie.

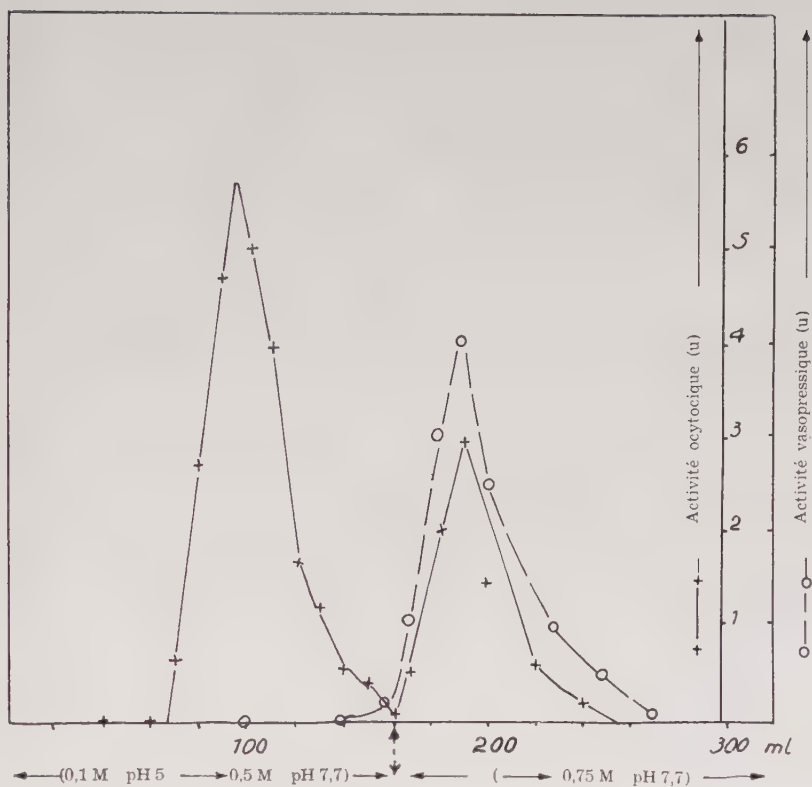


Figure 6 : Chromatographie des hormones neurohypophysaires de la grenouille sur Amberlite IRC 50

— Matériel : 200 u en activité ocytocique ; 200 u en activité vasopressique
 — Colonne : $0,9 \times 10$ cm — Mélangeur — 50 ml
 --- Tampons : I Acétate d'ammonium pH 5 0,1 M
 II Gradient » » pH 7,7 0,5 M
 III » » » pH 7,7 0,75 M

Lorsqu'une purification supplémentaire est nécessaire, elle est effectuée par une combinaison électrophorèse-chromatographie (comme dans le cas du poulet). La composition en acides aminés de cette molécule à activité ocytocique, vasopressique et natriférique a été déterminée (*Chapitre III*).

La posthypophyse de grenouille renferme deux hormones différentes : une hormone qui semble s'apparenter à l'ocytocine et une hormone à activité vasopressique et ocytocique, identique à celle trouvée chez le poulet : la vasotocine.

La vasotocine se trouve donc identifiée dans deux classes de vertébrés inférieurs.

Tableau XVIII

Séparation de deux hormones à activité ocytocique sur Amberlite IRC 50 après dissociation du complexe actif de grenouille

	Activité ocytocique		Activité vasopressique	
	en u	en % de la quantité adsorbée sur l'Amberlite	en u	en % de la quantité adsorbée sur l'Amberlite
Préparation II				
- Fraction 1	190	52	-	-
- Fraction 2	80	22	275	76
Préparation III				
- Fraction 1	150	75	-	-
- Fraction 2	80	40	150	100
Préparation IV				
- Fraction 1	70	35	-	-
- Fraction 2	80	40	135	68

CHAPITRE IV

Isolement des hormones des poissons osseux marins : Tacaud — Lieu noir — Merlu — Cabillaud

Poursuivant l'isolement des hormones neurohypophysaires des vertébrés, nous nous sommes intéressés à l'isolement des principes actifs chez les poissons.

Les poissons comprennent différentes classes : les poissons osseux (Téléostéens) groupent la majeure partie des poissons subsistant de nos jours. Ils se divisent en plusieurs familles anatomiquement définies, en particulier par la position de leurs nageoires ventrales. Les poissons cartilagineux (Elasmobranches) forment une autre classe importante ; d'après la position de la bouche, on distingue deux familles : les squales et les raies. Enfin les cyclostomes constituent la classe des vertébrés la plus primitive dont la lamproie est l'espèce la plus commune. Chacune de ces classes possède, d'une part, des représentants d'eau douce et d'eau de mer et, d'autre part, des espèces capables de vivre aussi bien en mer qu'en rivière.

Des hypophyses de poissons appartenant à chacun de ces groupes ont été prélevées. Les posthypophyses sont moins différenciées que chez les tétrapodes et la séparation en lobe « antérieur » et « postérieur » est impossible même chez les Téléostéens. Pour la première fois au cours de ce travail, les hypophyses entières sont utilisées. Chez les cyclostomes, non seulement la posthypophyse n'est pas individualisée, mais l'hypophyse est peu différenciée. Nous sommes, dans ce cas, obligés de prélever toute une zone cervicale.

Le *Tableau XIX* indique les teneurs en activités biologiques des hypophyses des différents poissons étudiés. Les hypophyses des Téléostéens marins fournissent les poudres acétoniques les plus actives : elles titrent, suivant les espèces, de 0,2 à 0,6 u au milligramme en activités ocytocique et vasopressique. Les poissons cartilagineux possèdent des hypophyses volumineuses renfermant très peu d'acti-

vités ocytocique et hydroosmotique. L'activité vasopressique n'est pas décelable car les extraits ont un effet dépressif sur le rat. La faible teneur en activité biologique des hypophyses de cyclostomes s'explique en partie par la mauvaise individualité de la glande.

Tableau XIX

Activités biologiques des poudres hypophysaires
de différentes espèces de poissons étudiées

	Activité ocytocique (u/mg)	Activité vasopressique (u/mg)
I - Poissons osseux		
- Marins :		
- Tacaud	0,60	0,50
- Lieu	0,50	0,50
- Merlu	0,50	0,30
- Thon	0,30	0,30
- Cabillaud	0,25	0,25
- Eau douce :		
- Carpe	0,05	0,03
II - Poissons cartilagineux		
- Chien de mer	0,01	0,007
- Raie	0,005	Dépressive
III - Cyclostomes		
- Lamproie	0,002	Dépressive

L'isolement des hormones neurohypophysaires de quelques téléostéens marins (Gadidés) a été entrepris. Cette étude concerne le tacaud (*Gadus luscus*), le lieu noir (*Pollachius virens*), le merlu (*Merluccius merluccius*) et le cabillaud (*Gadus morhua*)*.

(*) Nous sommes heureux de remercier ici l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes, ainsi que les Laboratoires CHOAY qui nous ont aidé à réaliser la collecte des glandes de tacaud. Nous remercions également le Professeur WILHELMI, le Docteur G. PICKFORD et The endocrinology study section, Institutes of Health, qui nous ont fourni les poudres hypophysaires de lieu noir, de merlu et de cabillaud.

1) Préparation des complexes actifs.

Les préparations les plus importantes de complexe actif ont été effectuées à partir des poudres acétoniques hypophysaires du tacaud et du lieu noir. Comme chez les espèces de vertébrés inférieurs précédemment étudiées, la précipitation du complexe actif au moyen du chlorure de sodium à 10 p. 100 s'effectue avec un mauvais rendement. Pour améliorer cette précipitation, il convient d'opérer à une teneur de 30 p. 100 en sel, l'extrait sulfurique étant préalablement concentré. On a aussi envisagé une addition de neurophysine soit de même espèce, soit de mammifère ; dans ce dernier cas, la pureté des préparations obtenues a pu être améliorée par des précipitations répétées.

a) TACAUD :

2.500 glandes de tacaud ont permis d'effectuer une première préparation sur 1 g de poudre acétonique hypophysaire totale, titrant 0,6 u/mg en activité ocytocique et 0,5 u/mg en activité vasopressive. 7.500 glandes ont fourni d'autre part 2,7 g d'une poudre titrant 0,35 u/mg des deux activités ocytocique et vasopressive.

Tableau XX

Préparation du complexe actif de différents poissons téléostéens marins

	Activité ocytocique		Activité vasopressive	
	en u	en % de la quantité initiale	en u	en % de la quantité initiale
Extraction par l'acide sulfurique 0,01 N				
- Tacaud I	470	78	350	70
- Lieu	540	100	600	100
- Merlu	480	96	250	83
- Cabillaud	280	100	280	100
Complexe actif				
- Tacaud I	335	55	255	43
- Lieu	410	82	300	60
- Merlu	260	52	130	43
- Cabillaud	190	68	200	71

1 g de poudre hypophysaire est extrait d'abord par 75 ml d'acide sulfurique 0,01 N, puis par 50 ml dans des conditions identiques à celles décrites pour les autres espèces de vertébrés. L'extrait obtenu (118 ml) renferme 70 et 78 % des activités biologiques de la poudre initiale. Amené à pH 3,9 par de l'acide sulfurique normal, il est soumis à une précipitation au moyen de chlorure de sodium 30 p. 100. Le précipité recueilli (4 ml) est dialysé. Le complexe actif représente 70 % des activités de l'extrait sulfurique (*Tableau XX*).

Dans la seconde préparation, l'extrait sulfurique a été concentré afin d'améliorer le rendement en complexe actif. On a en outre effectué une seconde précipitation de ce complexe à l'aide de chlorure de sodium à 15 p. 100, en opérant à petit volume. Dans ces conditions, le complexe actif dialysé représente 85 % des activités de l'extrait initial.

b) LIEU NOIR :

Différentes préparations ont été effectuées sur des quantités de l'ordre de 1 à 5 g de poudre hypophysaire titrant 0,5 u/mg en activité ocytotique et en activité vasopressique.

Dans tous les cas, la précipitation du complexe actif est obtenue par addition de chlorure de sodium à la teneur de 30 p. 100. Dans certaines préparations, l'extrait sulfurique a été additionné soit de neurophysine de lieu, soit de neurophysine de bœuf ou de cheval. L'addition de neurophysine d'un de ces mammifères permet la formation d'un complexe stable au cours de la précipitation fractionnée.

1 g de poudre acétonique hypophysaire est extrait par 70 ml d'acide sulfurique 0,01 N (deux fois), puis l'extrait obtenu (138 ml) est concentré à 30 ml à l'évaporateur rotatif Eral (25°). Les activités initiales retrouvées à 100 % dans cet extrait sont précipitées par addition du chlorure de sodium à la teneur de 30 p. 100. Le complexe actif obtenu représente 60 à 80 % des activités biologiques de l'extrait (*Tableau XX*). Ce rendement est amélioré (90 %) lorsque de la neurophysine de bœuf a préalablement été ajoutée.

c) MERLU :

1 g de poudre acétonique hypophysaire titrant 0,5 u/mg en activité ocytotique et 0,3 u/mg en activité vasopressique est traité par 70 ml, puis par 50 ml d'acide sulfurique 0,01 N, suivant les conditions habituelles. On effectue ensuite une précipitation par addition de 30 g p. 100 de chlorure de sodium. Les activités biologiques du complexe actif recueilli sont de l'ordre de 52 % de celles de l'extrait initial.

d) CABILLAUD :

1 g de poudre acétonique hypophysaire de cabillaud titre 0,2 u/mg en activité ocytocique et en activité vasopressique. Après une extraction de cette poudre par deux fois 70 ml d'acide sulfurique 0,01 N et une concentration à 30 ml de l'extrait obtenu, on précipite le complexe actif au moyen de chlorure de sodium à 30 p. 100. Ce complexe représente 70 % des activités biologiques extraites. Le *Tableau XX* indique les résultats obtenus.

2) Elimination de la protéine support.

Les complexes actifs obtenus à partir de chaque espèce de poissons osseux sont dissociés au moyen de l'acide trichloracétique à 5 %.

Dans chaque cas, le dialysé précédemment obtenu est ajusté à un volume de 15 ml et à une concentration de 0.25 % en acide acétique. Il est ensuite précipité deux fois par addition de 0,75 ml d'acide trichloracétique 100 % (P/V). Les deux liquides surnageants sont passés sur Amberlite IR 45, forme acétate (1,5 × 10 cm).

Les rendements en activité de cette dissociation sont variables suivant les espèces (*Tableau XXI*), mais sont particulièrement élevés en ce qui concerne les préparations de tacaud.

3) Mise en évidence de deux hormones à activité ocytocique. Isolement de la vasotocine de Tacaud et de Lieu noir.

Les filtrats d'Amberlite IR 45 sont, pour chaque préparation, adsorbés sur une colonne d'Amberlite IRC 50 (0,9 × 10 cm), forme H, et la chromatographie est effectuée suivant la technique employée pour les autres vertébrés.

Après équilibration à pH 5 (tampon acétate d'ammonium pH 5,0, 0.1 M), on établit d'abord un gradient avec un tampon pH 7,7, 0.5 M acétate d'ammonium, puis après élution de 160 ml, on remplace ce tampon par le tampon acétate d'ammonium pH 7,7, 0,75 M. L'emplacement du matériel peptidique est déterminé par la micro-réaction de LOWRY [61] et les pics actifs sont détectés par le dosage des activités ocytocique, vasopressique et hydroosmotique.

Un schéma identique est obtenu pour les quatre espèces de poissons téléostéens étudiés.

Deux principes actifs possédant une activité ocytocique sont mis en évidence (*fig. 7*).

	Activité ocytotique		Activité vasopressique	
	en u	en % de la quantité du complexe initial	en u	en % de la quantité du complexe initial
I - Dissociation du complexe				
- Tacaud I	330	98	230	91
- Lieu	320	78	280	93
- Merlu	225	86	75	57
- Cabillaud	145	76	120	60
II - Chromatographie du surnageant sur Amberlite IRC 50				
	en u	en % de la quantité adsorbée sur l'Amberlite	en u	en % de la quantité adsorbée sur l'Amberlite
- <u>Tacaud I</u>				
- Fraction 1	170	57	pas d'activité	-
- Fraction 2	40	13	140	70
- <u>Lieu</u>				
- Fraction 1	170	53	pas d'activité	-
- Fraction 2	100	30	185	66
- <u>Merlu</u>				
- Fraction 1	83	37	pas d'activité	-
- Fraction 2	30	13	70	93
- <u>Cabillaud</u>				
- Fraction 1	64	45	pas d'activité	-
- Fraction 2	40	27	80	66

Tableau XXI

Séparation de deux hormones à activité ocytotique sur Amberlite IRC 50 après dissociation du complexe actif des différents poissons osseux marins étudiés

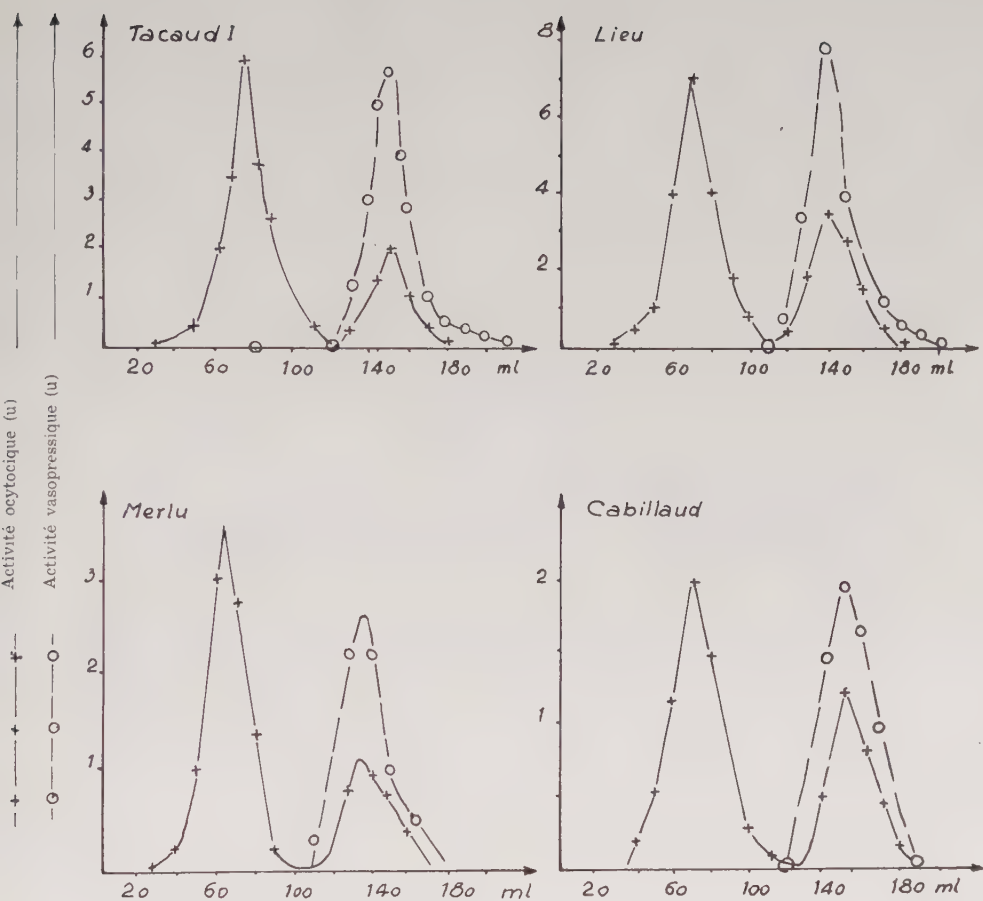


Figure 7 : Chromatographie des hormones neurohypophysaires de différents poissons osseux marins, sur Amberlite IRC 50

Le premier pic à activité ocytocique est élué à un niveau voisin de celui de l'ocytocine des mammifères et représente en moyenne 50 % de l'activité ocytocique placée sur la colonne (*Tableau XXI*). Le second pic à activité ocytocique possède également 70 % de l'activité vasopressique placée sur la colonne. D'autre part, le dosage de l'activité hydroosmotique a été effectué : les courbes des deux activités vasopressique et hydroosmotique sont superposables.

La position de cette deuxième substance sur le chromatogramme est identique pour les quatre poissons téléostéens étudiés : elle est éluée entre 120 et 180 ml (*fig. 7*). Cette nouvelle hormone possède donc les mêmes activités biologiques et le même comportement chromatographique que la vasotocine de grenouille et de poulet.

Une étude chimique de cette hormone a pu être entreprise chez deux espèces : le tacaud et le lieu noir (cf. *Chapitre III*).

Chez les poissons osseux, les Gadidés possèdent deux hormones neurohypophysaires : une hormone de la même famille que l'ocytocine et la vasotocine, déjà mise en évidence chez les oiseaux et les batraciens.

Cette étude devra être étendue aux autres familles de téléostéens et aux deux autres classes de poissons : les cartilagineux et les cyclostomes.

Au cours de ce travail, deux hormones neurohypophysaires ont été mises en évidence dans chacune des espèces de vertébrés étudiés. Tous ces vertébrés possèdent une hormone à activité ocytocique identique ou proche de l'ocytocine du bœuf. Chez les vertébrés inférieurs, une deuxième hormone à activité ocytocique et vasopressique : la vasotocine, a été identifiée. Au cours de l'évolution, ce peptide actif semble avoir précédé la vasopressine des mammifères.

**STRUCTURE
DES HORMONES NEUROHYPOPHYSAIRES
CARACTERISATION DE LA VASOTOCINE**

Les hormones neurohypophysaires du bœuf et du porc ont été isolées [47, 48, 49, 50] et leur structure est maintenant bien établie [65 à 72].

Ces peptides possèdent des activités biologiques communes mais diffèrent entre eux par le degré de ces activités. Pour certains auteurs, il a donc semblé possible de déceler, par une étude pharmacologique, la présence de ces hormones dans des extraits posthypophysaires d'origine variée. Ainsi VAN DYKE et ses collaborateurs [77] ont exploité le fait que l'arginine-vasopressine possède les activités vasopressive et antidiurétique (dosée sur le chien) dans un rapport 1/1, alors que la lysine-vasopressine possède ces deux activités, mesurées dans les mêmes conditions dans le rapport 6/1. Effectuant des dosages biologiques sur les extraits de la posthypophyse de l'homme, du singe, du chien, du rat, du mouton et du chameau, compte tenu des rapports entre les activités biologiques obtenues, ils ont conclu à la présence d'arginine-vasopressine chez ces espèces.

HELLER [78], par cette méthode, a décelé la lysine-vasopressine chez l'hippopotame, alors que SAWYER [79] a conclu que les marsupiaux et les monotrèmes possédaient de l'arginine-vasopressine.

Poursuivant leurs investigations, ces mêmes auteurs [74, 75] ont étudié les extraits posthypophysaires de quelques vertébrés inférieurs. Par comparaison des effets pharmacologiques obtenus avec ceux donnés par la vasotocine synthétique [73], ils ont suggéré la présence de ce peptide chez plusieurs vertébrés inférieurs. Ils ont, d'autre part, conclu à la présence de l'ocytocine chez ces mêmes espèces [80, 81].

Bien qu'une telle étude de physiologie comparée présente l'avantage sur une étude chimique de nécessiter très peu de matériel, elle repose uniquement sur des données indirectes établies à partir des extraits bruts de posthypophyse ou même d'hypophyse totale, dans lesquels se trouvent de nombreuses substances; elle postule d'autre part qu'à un profil donné d'activités biologiques correspond une seule structure.

Après avoir isolé deux peptides actifs dans chaque classe de vertébrés, il nous a paru intéressant d'entreprendre l'étude chimique de ces molécules, afin d'en établir la structure. Une telle étude est réalisée en plusieurs étapes. Nous décrirons successivement les expériences qui ont permis d'établir la structure de trois hormones neurohypophysaires : l'ocytocine, la vasopressine et la vasotocine, isolés des différents vertébrés étudiés.

Structure des ocytocines du cheval du mouton et de la baleine à nageoire

Depuis les travaux de SANGER sur l'insuline, les techniques permettant une étude de la structure primaire des protéines ont été largement employées.

Une telle étude ne peut être entreprise que lorsqu'on dispose d'un matériel homogène. La substance à étudier est alors soumise à différents tests de pureté et la composition en acides aminés est envisagée. Cette « analyse élémentaire » de la molécule, une fois établie, le nombre et la nature des résidus identifiés suggèrent les possibilités d'attaque de la molécule. Dans le cas des hormones neurohypophysaires, la présence d'un résidu de cystine conduit à oxyder le pont disulfure et à identifier une seule chaîne peptidique contenant deux résidus d'acide cystéique. Des méthodes chimiques et enzymatiques complémentaires permettent de connaître les deux extrémités de la chaîne peptidique : on identifie ainsi l'acide aminé N-terminal et l'acide aminé C-terminal. L'enchaînement des acides aminés est enfin reconstitué après identification des fragments obtenus en effectuant soit une hydrolyse partielle acide de la chaîne, soit des coupures enzymatiques spécifiques.

Les structures des ocytocines du cheval, du mouton et de la baleine à nageoire ont été déterminées.

A) CRITERES DE PURETE

Par chromatographie sur Amberlite IRC 50, on observe une coïncidence très satisfaisante des courbes de l'activité ocytocique et du matériel peptidique déterminé par le dosage de LOWRY [61]. D'après

ce critère, les ocytocines du cheval, du mouton et de la baleine sont homogènes. Ce résultat a été confirmé par l'étude de leur comportement ionophorétique (critère faisant appel à la charge) et chromatographique sur papier (critère faisant appel à la solubilité).

1) Ionophorèse.

Le cheminement d'un peptide soumis à une ionophorèse sur papier est fonction de sa charge et varie suivant le pH. Si la préparation contient des impuretés de charge différente, elles se répartissent sur l'ionogramme. Les différences de cheminement entre le peptide et les impuretés seront accentuées pour certains pH. Une préparation peut être considérée comme homogène si, par ionophorèse à divers pH, elle donne dans tous les cas, après révélation, une tache unique.

Les préparations d'ocytocine du cheval et du mouton ont été soumises à des ionophorèses à pH 4, pH 5, pH 6,5 et pH 8,5. La technique utilisée est la suivante : des quantités de produit correspondant à 50 unités d'activité ocytocique des hormones sont placées côte à côte sur une bande de papier prise en son milieu (10 × 50 cm, papier Whatman n° 1). Le papier est imbibé de solution tampon de pH choisi, puis la bande est serrée entre deux plaques de verre (10 × 30 cm). Elle plonge par ses extrémités libres dans deux cuves contenant du même tampon. Une électrode de charbon étant placée dans chaque cuve, on applique une tension aux bornes de 500 volts (soit 10 volts par cm) et l'opération dure de quatre à six heures suivant le pH. On sèche ensuite la feuille et on peut effectuer des révélations différentes : révélation à la ninhydrine en solution à 0,1 % dans du butanol normal, qui permet de déceler les acides aminés et certains peptides (coloration jaune ou violette), révélation au bleu de bromophénol où les peptides apparaissent en bleu [59], révélation à l' α nitroso β naphthol, réactif spécifique du résidu tyrosine [62].

Pour chaque pH choisi, des essais ont été réalisés pour l'ocytocine du bœuf, du cheval et du mouton, deux quantités de la même hormone étant placées sur le même ionogramme afin de pouvoir effectuer, d'une part la révélation à la ninhydrine, puis au réactif de Gerngross, et d'autre part la révélation au bleu de bromophénol. On obtient pour l'ocytocine du bœuf une tache unique située au même niveau, quelle que soit la révélation. Les ocytocines du cheval et du mouton donnent une tache comparable à celle de l'ocytocine du bœuf.

Le *Tableau XXII* indique les résultats : après ionophorèse sur papier à différents pH, les comportements des ocytocines du cheval

et du mouton sont identiques. Une seule tache est obtenue par révélation à l'aide des trois réactifs précédemment cités. Aucune impureté n'est décelable dans ces préparations par ce critère de pureté. Il est à noter que l'adsorption du peptide sur le papier, variable suivant le tampon utilisé, peut apporter des modifications de chemine-
ments.

Tableau XXII

Ionophorèse des ocytocines du cheval et du mouton

(Cheminement vers la cathode par rapport
au dinitrophénylétanolamine (en mm) à différents pH)

pH	Ocytocine du cheval	Ocytocine du mouton
pH = 4 Tampon phosphate-citrate 0,05 M	71	71
pH = 5 Tampon acétate d'ammonium 0,05 M	78	81
pH = 6,5 Tampon acétate de pyridine 0,06 M	25	26
pH = 8,5 Tampon véronal.véronal sodé 0,06 M	3	2

2) Chromatographie.

Un peptide soumis à une chromatographie sur papier migre avec un Rf particulier pour le solvant utilisé. Des impuretés de solubilité différente se placent à des niveaux distincts. Une préparation peptidique est considérée comme homogène si, après des chromatographies sur papier dans différents systèmes, elle donne, dans chaque cas, une seule tache quelle que soit la révélation effectuée.

Les préparations des ocytocines du cheval et du mouton ont été soumises à des chromatographies dans différents solvants. On a ainsi utilisé les systèmes :

- I) Butanol 40, acide acétique 10, eau 50.
- II) Butanol 30, acide acétique 6, eau 24, pyridine 20.

Dans chacun de ces solvants, les ocytocines du cheval et du mouton migrent avec des R_f identiques : $R_f = 0,65$ pour le système I et $R_f = 0,70$ pour le système II, et donnent une tache unique révélabile à la ninhydrine et à l' α nitroso β naphthol. Aucune impureté n'est décelable par ce critère de pureté.

B) COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS

La composition en acides aminés peut être déterminée après hydrolyse totale du peptide par l'analyse semi-quantitative des acides aminés, suivant le procédé de chromatographie de partage sur papier qui demande une quantité de peptide initial de l'ordre de $0,02 \mu$ mole, ou quantitativement par passage de $0,1 \mu$ mole de l'échantillon sur un échangeur d'ions convenablement choisi.

1) Composition semi-quantitative.

Le peptide est tout d'abord hydrolysé : en solution dans de l'acide chlorhydrique 6 N. Il est placé dans un tube scellé et laissé dix-huit heures à 100° .

L'hydrolysats obtenu, débarrassé de l'acide chlorhydrique par évaporation sous vide, en présence de soude, est constitué par les acides aminés qui composent le peptide. Ceux-ci sont identifiables par leur R_f , lorsqu'ils sont soumis à des chromatographies sur papier dans différents systèmes-solvants. L'intensité de la tache donnée par chaque acide aminé présent, révélé par la ninhydrine, peut être évaluée par rapport à une gamme de $0,01 \mu$ mole à $0,1 \mu$ mole d'acides aminés témoins [82].

Pour les hydrolysats obtenus à partir des ocytocines du cheval et du mouton, les chromatographies dans le mélange-solvant butanol 75, acide formique 15, eau 10 (que nous désignerons par la suite dans ce chapitre : solvant butanol-acide formique) ont permis de déterminer la présence de la cystine (Cys)₂, d'acides aminés neutres et acides (groupes I et II), de la proline (Pro), de la tyrosine (Tyr) et d'une tache plus intense au niveau des leucines (Leu - ILeu).

Par chromatographie sur papier tamponné à pH 4 par un tampon phosphate-citrate 0,06 M dans un solvant butanol saturé par le même tampon, on identifie en quantité équimoléculaire la leucine (Leu) et l'isoleucine (ILeu).

Par chromatographie bidimensionnelle (la première chromatographie se faisant dans le solvant butanol-acide formique, la seconde dans le phénol saturé par de l'eau, en atmosphère ammoniacale, ou par un tampon soit pH 4, soit pH 10), on précise la composition en acides aminés neutres et acides : l'acide aspartique (Asp), l'acide glutamique (Glu), la glycine (Gly) apparaissent en quantité équimoléculaire.

Après hydrolyse totale par chromatographie semi-quantitative sur papier, huit acides aminés sont donc identifiés en proportions sensiblement équimoléculaires dans les ocytocines du cheval et du mouton, soit :

(Cys)₂, Asp, Gly, Pro, Tyr, Leu, ILeu, Glu

Cette composition est identique à celle de l'ocytocine du bœuf.

2) Composition quantitative.

Le peptide est hydrolysé par l'acide chlorhydrique dans les conditions décrites ci-dessus. La composition quantitative est effectuée suivant la technique de SPACKMAN, STEIN et MOORE [84] en utilisant un auto-analyseur Spinco-Beckman.

Pour le dosage des acides aminés neutres et acides, on utilise une grande colonne ($0,9 \times 158$ cm) d'Amberlite IR 120 (CG 120), type III de 400 à 600 mesh, les particules ayant des diamètres de 31 à 41 microns. On fait d'abord passer à une vitesse constante de 30 ml/heure, 250 ml de tampon citrate de sodium, pH 3,25, 0,2 M, puis 250 ml de tampon, pH 0,25, 0,2 M. La chromatographie dure dix-sept heures.

Pour le dosage des acides aminés basiques, on utilise une petite colonne ($0,9 \times 15$ cm) d'Amberlite IR 120, type III, mais dont les particules ont 19 à 25 microns de diamètre. Le tampon utilisé est du citrate de sodium 0,35 M, pH 5,28. La chromatographie dure quatre heures.

Les deux colonnes sont maintenues à 50°, l'éluat passe dans un photolorimètre ayant deux sensibilités à 570 m μ et une à 440 m μ (proline).

Les coefficients sont déterminés d'après un standard d'acides aminés à 1 μ mole/2 ml.

N.B. : Les abréviations utilisées pour désigner les résidus d'acides aminés sont celles données par BRAND et EDSALL [83]; l'acide cystéique étant en outre figuré par le symbole CySO₃H.

Le dosage est possible pour des quantités allant de 0,05 μ mole à 1 μ mole.

Les analyses quantitatives des acides aminés des ocytocines du mouton et de la baleine ont été effectuées ; parallèlement, la composition en acides aminés de l'ocytocine du bœuf, connue depuis longtemps, a été déterminée sur un échantillon préparé à cet effet.

Le *Tableau XXIII* indique que les résultats d'analyse sont sensiblement identiques pour les trois molécules d'ocytocine. Il montre que dans le cas des ocytocines du mouton et de la baleine, comme dans celui de l'ocytocine du bœuf, la cystine est partiellement dégradée au cours de l'hydrolyse. Parmi les produits de transformation, on trouve de l'acide cystéique et de la sérine. D'autre part, la tyrosine est également en partie détruite en raison de la présence de cystine.

On peut donc attribuer à l'ocytocine du mouton et à celle de la baleine la composition quantitative suivante, composition identique à celle de l'ocytocine du bœuf :



L'analyse quantitative en acides aminés de ces molécules apporte une preuve supplémentaire de leur homogénéité. D'autre part, elle permet de déterminer l'activité moléculaire de ces préparations (activité calculée pour une μ mole d'hormone). On trouve une valeur de 600 à 700 unités par μ mole.

C) STRUCTURE

Les ocytocines du cheval, du mouton et de la baleine sont des nonapeptides comme l'ocytocine du bœuf. Une étude de structure de ces trois molécules revient à déterminer l'enchaînement des neuf résidus d'acides aminés. Il a tout d'abord fallu connaître le nombre de chaînes constituant la molécule, celle-ci pouvant être composée de deux fragments, étant donné qu'elle contient un résidu de cystine. Ensuite l'acide aminé N-terminal de la chaîne peptidique a été déterminé sur la molécule oxydée par l'application de la technique de Sanger. L'enchaînement N-terminal a été déduit en utilisant la technique d'Edman. D'autre part, l'extrémité C-terminale particulière de cette molécule a été établie après l'étude de l'action d'un enzyme : la subtilisine. Enfin l'enchaînement des acides aminés a été démontré après l'identification des dipeptides et tripeptides libérés par une hydrolyse partielle acide de la chaîne.

Tableau XXIII

Composition en acides aminés de l'ocytocine du mouton et de l'ocytocine de la baleine

Acide aminé	Ocytocine de boeuf		Ocytocine de mouton		Ocytocine de baleine		Nombre de résidus par molécule d'Ocytocine
	Quantité d'acide aminé exprimée en μ mole	Rapport molaire l'acide glutamique étant pris comme unité	Quantité d'acide aminé exprimée en μ mole	Rapport molaire l'acide glutamique étant pris comme unité	Quantité d'acide aminé exprimée en μ mole	Rapport molaire l'acide glutamique étant pris comme unité	
Asp	0,153	1,10	0,165	0,94	0,221	1,04	1
Glu	0,138	1,00	0,175	1,00	0,211	1,00	1
Pro	0,145	1,05	0,183	1,04	0,279	1,32	1
Gly	0,161	1,16	0,186	1,06	0,246	1,16	1
Leu	0,098	0,71	0,133	0,76	0,175	0,85	1
1/2(Cys)*	0,139	1,00	0,147	0,84	0,194	0,91	1
Cys	0,160	1,16	—	—	0,109	0,51	2
Ser*	0,055	0,40	0,159	0,90	0,177	0,84	—
Tyr*	0,019	0,14	0,038	0,21	0,054	0,24	—
	0,061	0,44	0,076	0,43	0,046	0,21	1

(*) La cystine est partiellement détruite au cours de l'hydrolyse. Parmi les produits de dégradation, on trouve de l'acide cystéique et de la sérine. La tyrosine est également en partie détruite, en raison de la présence de la cystine.

1) Oxydation par l'acide performique.

Les molécules d'ocytocines de cheval et de mouton renferment un résidu de cystine, donc un pont disulfure. Ce pont S-S peut relier soit deux fragments peptidiques (pont interchaîne), soit deux résidus de la même chaîne (pont intrachaîne). Par oxydation de la molécule à l'aide de l'acide performique [85], il est possible d'obtenir la rupture de ce pont par transformation de la cystine en deux résidus d'acide cystéique. Si la molécule est constituée par une chaîne unique, cette oxydation ne doit pas la scinder en deux fragments.

3 à 8 μ mole d'ocytocine sont oxydées par 0,25 ml à 0,5 ml d'acide performique (1 volume d'eau oxygénée 30 % + 15 volumes d'acide formique à 99 % laissés une heure et demie à la température ordinaire). L'oxydation s'effectue pendant cinquante minutes à -10° pour éviter la dégradation de la tyrosine. Après dilution et évaporation répétée à froid pour chasser l'excès d'oxydant, un échantillon est prélevé et hydrolysé. On constate par chromatographie sur papier dans le phénol tamponné à pH 10 une transformation totale de la cystine en acide cystéique. Le produit d'oxydation est examiné par ionophorèse sur papier à pH 4 (tampon phosphate-citrate 0,05 M, 10 volts/cm, 7 h). On observe que l'ocytocine a été totalement transformée en un seul peptide acide révélaible à la ninhydrine et à l' α nitroso β naphthol. Les cheminements respectifs sont de 6 cm vers la cathode pour l'ocytocine intacte, et de 8 cm vers l'anode pour l'ocytocine oxydée.

La rupture du pont disulfure de la cystine ne scinde pas la molécule en deux fragments et on a, comme pour l'ocytocine du bœuf, une chaîne unique.

2) Enchaînements terminaux.

a) ENCHAÎNEMENT N-TERMINAL

— *Technique de Sanger :*

La technique de SANGER [86, 87] consiste à faire agir en milieu alcalin le dinitrofluorobenzène avec le groupe aminé du peptide pour donner un dérivé dinitrophénylé DNP-peptide. L'hydrolyse acide libère ensuite les acides aminés constituants, à l'exception de l'acide aminé N-terminal libéré sous forme de dinitrophénylaminoacide jaune. On applique la technique sur 2,5 μ mole d'ocytocine du cheval ou d'ocytocine du mouton, oxydée par l'acide performique. Le peptide est dissous dans 1 ml de triméthylamine à 5 p. 100 et on ajoute

0,1 ml de dinitrofluorobenzène à 2 p. 100 dans l'acétone et on laisse réagir pendant quatre heures sous agitation, à l'obscurité, à la température du laboratoire. L'excès de réactif est éliminé par extraction à l'éther saturé d'eau et la solution aqueuse est évaporée. On hydrolyse en tube scellé le produit de condensation (HCl 6 N, 8 heures à 100°).

L'hydrolysats est extrait à l'éther saturé d'eau, mais la coloration jaune reste en majeure partie dans la phase aqueuse. La phase éthérée ne contient aucun dérivé dinitrophénylé. Parmi les dérivés acidodsolubles, seul le dérivé dinitrophénylé de l'acide cystéique DNP-CySO₃H est identifié dans l'hydrolysats par chromatographie sur papier Whatman n° 1 dans le mélange butanol-acide formique : Rf = 0,4, et par ionophorèse sur papier à pH 4, tampon phosphate-citrate 0,05 M 10 v/cm 3 heures. Le cheminement est de 13 cm vers l'anode pour le DNP-aminoacide provenant de l'ocytocine du cheval. Un résultat identique est obtenu dans le cas de l'ocytocine du mouton.

— *Technique de Edman* [88] :

Le phénylisothiocyanate peut dans certaines conditions réagir avec un peptide en milieu alcalin, il donne un phényl-thiocarbamyl-peptide. En milieu acide acétique concentré contenant de l'acide chlorhydrique, l'acide aminé N-terminal est rapidement libéré sous forme d'une phénylthiohydantoïne (PTH-aminoacide), alors que le reste du peptide n'est pas touché. On peut répéter la copulation, la scission, et détacher ainsi un à un les aminoacides à partir de l'extrémité N-terminale.

Appliquée à 8 μ mole d'ocytocine du cheval ou d'ocytocine du mouton oxydée par l'acide performique, cette technique a permis de déterminer l'enchaînement des quatre premiers acides aminés de chaque molécule. Le produit est dissous dans 1,5 ml de pyridine à 50 p. 100 contenant 0,03 % de bleu de bromothymol et on ajoute 0,2 ml de phénylisothiocyanate. On laisse réagir pendant trois heures à 37° en maintenant le pH à 8-9 à l'aide de triméthylamine. Après élimination de l'excès de réactif par le benzène, la solution est évaporée. La phénylthiohydantoïne de l'acide aminé est détachée par la scission du phénylthiocarbamylpeptide au moyen du mélange acide acétique (5 volumes), acide chlorhydrique 12 N (1 volume) agissant à 37° pendant deux heures.

La phase aqueuse est soumise à une extraction par de l'acétate d'éthyle saturé d'eau. Aucun PTH-aminoacide n'est solubilisé dans la phase organique. La phase aqueuse est alors soumise à une électro-

dialyse dans un appareil à quatre compartiments (220 V pendant six heures). La solution anodique est recueillie puis concentrée. Le produit contenu est identifié par ionophorèse sur papier à pH 4 (tampon phosphate, citrate 0,05 M, 10 volts/cm, 3 heures), la révélation étant effectuée à l'aide du réactif iodoplatinique de TOENNES et KOLB [89]; les phénylthiohydantoïnes apparaissent alors en blanc sur un fond rose. Le cheminement obtenu est de 10 cm vers l'anode et permet l'identification de la phénylthiohydantoïne de l'acide cystéique. Ce résultat confirme celui obtenu avec la technique de Sanger.

Le peptide résidu qui se trouve dans le compartiment central et cathodique de l'électrodialyseur est récupéré et on fait à nouveau réagir le phénylisothiocyanate. La scission est effectuée de façon semblable, mais ici la phénylthiohydantoïne est séparée par extraction à l'acétate d'éthyle. L'hydrolyse de ce dérivé (HCl 6 N 150°, 16 heures) régénère la tyrosine identifiée par chromatographie sur papier. En répétant une troisième, puis une quatrième fois l'opération, on détache successivement l'isoleucine puis l'acide glutamique.

Les résultats sont identiques pour l'ocytocine du cheval et celle du mouton. L'enchaînement N-terminal de l'ocytocine oxydée est donc * :



b) ENCHAINEMENT C-TERMINAL

La carboxypeptidase A libère généralement l'acide aminé C-terminal d'un peptide dont le groupement carboxylique est libre. Il est donc logique d'utiliser en premier lieu cet enzyme dans l'étude de l'enchaînement C-terminal d'un peptide. Néanmoins, il a été démontré que la carboxypeptidase A n'agit pas sur l'ocytocine du bœuf, parce que le carboxyle C-terminal est amidé. La présence de la glycynamide dans cette hormone a été prouvée par TUPPY [66] qui a fait appel à un enzyme protéolytique bactérien isolé du *Bacillus subtilis* [90] : la subtilisine.

Nous avons donc fait agir la subtilisine sur l'ocytocine du mouton et sur l'ocytocine du cheval, sans oxydation préalable de la molécule.

0,1 μ mole d'ocytocine non oxydée du cheval ou d'ocytocine du mouton, dissous dans 0,02 ml de bicarbonate à 0,025 p. 100,

(*) Nous avons adopté la convention de SANGER [91] suivant laquelle lorsque l'enchaînement de deux acides aminés est connu, les symboles sont séparés par un point, l'acide aminé qui participe à la liaison par son carboxyle étant écrit en premier. Lorsque l'enchaînement est inconnu, les symboles sont placés entre parenthèses et séparés par une virgule.

pH 7,8, sont traités par 0,01 mg de subtilisine** dissous dans 0,01 ml d'eau distillée. On laisse vingt-quatre heures à 37°, puis on arrête l'attaque en inactivant l'enzyme par ébullition de trois minutes. L'hydrolysats est examiné par électrophorèse sur papier Whatman n° 1 à pH 6,5 acétate de pyridine 10 volts/cm, deux heures. On observe la présence d'une substance basique : cheminement de 9 cm vers la cathode donnant avec la ninhydrine une coloration jaune qui passe au violet. On identifie ainsi la glycnamide Gly (NH₂) par comparaison avec le témoin synthétique. Cette amide occupe obligatoirement la position C-terminale. D'autre part, l'hydrolysats contient un grand fragment représentant le reste du peptide.

La glycnamide une fois libérée, la carboxypeptidase peut alors détacher le pénultième résidu. Nous avons donc étudié l'action de la carboxypeptidase agissant après l'attaque de la subtilisine.

1 μ mole d'ocytocine non oxydée est hydrolysée de la façon décrite plus haut par 0,01 mg de subtilisine, puis après inactivation de l'enzyme on ajoute 0,02 ml d'une solution de carboxypeptidase 1 mg/ml. On laisse la réaction se faire pendant quinze heures à 37°. L'examen par chromatographie sur papier de l'hydrolysats indique, à côté de la glycnamide détachée par l'action de la subtilisine, la libération en quantité importante de la leucine et en très faible quantité de la tyrosine.

En conclusion, l'enchaînement C-terminal de l'ocytocine du cheval ou de celle du mouton est donc :



3) Hydrolyse partielle acide.

Une hydrolyse à 37° par de l'acide chlorhydrique 12 N pendant un temps long scinde la molécule en peptides courts qui permettent de reconstituer l'enchaînement [92]. Aucun remaniement ne s'effectue au cours de cette dégradation.

6 μ mole d'ocytocine oxydée sont hydrolysées trois jours à 37° par HCl 12 N (1 ml). La séparation des peptides obtenus se fait d'abord par chromatographie préparative sur papier dans le mélange butanol-acide formique, puis après élution des substances, par ionophorèse à pH 2,75 sous haut voltage (acide acétique 0,2 N, 40 volts/cm, 3/4 d'heure).

(**) La subtilisine nous a été très aimablement fournie par le Professeur OTTESEN, Carlsberg, Laboratories, Copenhague.

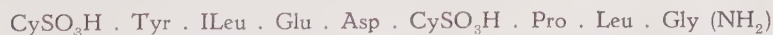
On obtient le schéma donné par la *figure 8*. En particulier, les peptides (Asp, CySO_3H), (CySO_3H , Pro, Leu), (Pro, Leu) et (Leu, Gly) sont isolés.

Sachant que la glycine occupe la position C-terminale, on en déduit l'enchaînement CySO_3H . Pro . Leu . Gly (*fig. 9*), le deuxième résidu de CySO_3H fait partie de l'enchaînement N-terminal CySO_3H . Tyr . Ileu . Glu. Le peptide (Asp, CySO_3H) peut compléter uniquement l'enchaînement CySO_3H . Pro . Leu . Gly (NH_2) et donner Asp . CySO_3H . Pro . Leu . Gly (NH_2).

P e p t i d e s	Méthodes
Gly(NH_2)	Subtilisine
Leu.Gly(NH_2)	Subtilisine + Carboxypeptidase
(Pro,Leu)	Hydrolyse partielle acide
(CySO_3H ,Pro,Leu)	"
(Asp, CySO_3H)	"
CySO_3H .Tyr.Ileu.Glu.	Technique d'Edman
CySO_3H .Tyr.Ileu.Glu.Asp. CySO_3H .Pro.Leu.Gly(NH_2)	

Figure 9 : Détermination de la structure de l'ocytocine oxydée

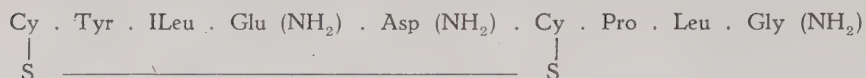
L'ensemble des résultats permet d'attribuer aux ocytocines oxydées du cheval et du mouton la structure :



identique à celle du bœuf [65, 66].

D'autre part, les cheminements ionophorétiques et de chromatographie sur colonne de ces ocytocines étant identiques à ceux de l'ocytocine du bœuf, on en déduit que les résidus des acides aspartique et glutamique sont amidés comme ils le sont dans l'ocytocine du bœuf.

Les deux résidus d'acide cystéique proviennent de la rupture du pont disulfure. La structure complète est donc :



L'ocytocine isolée du cheval et celle isolée du mouton sont identiques par leur composition et leur structure à l'ocytocine du bœuf. La composition quantitative de l'ocytocine de baleine est rigoureusement identique à celle de l'ocytocine trouvée chez les autres mammifères. Il est donc probable que sa structure soit identique à celle de l'ocytocine du bœuf, du cheval ou du mouton.

D'après la nomenclature proposée par ACHER [93], cette structure est prise comme structure de référence, les autres hormones neurohypophysaires pouvant être considérées comme des dérivés de l'ocytocine par substitution d'un ou plusieurs résidus.

CHAPITRE II

Structure des vasopressines du cheval du mouton et de la baleine

Parallèlement à l'étude de structure des ocytocines, nous avons effectué celle des vasopressines isolées du cheval, du mouton et de la baleine.

A) CRITERES DE PURETE

Les vasopressines isolées présentent les mêmes caractéristiques chromatographiques et biologiques. Comme précédemment dans le cas des préparations d'ocytocine, elles apparaissent homogènes d'après la coïncidence de la courbe d'activité vasopressique et de celle donnée par la coloration de Lowry. Elles ont été cependant soumises aux critères de pureté faisant appel à la charge (ionophorèse) et à la solubilité (chromatographie sur papier).

1) Ionophorèse.

Les ionophorèses sur papier sont effectuées à différents pH suivant la technique décrite pour le contrôle des ocytocines.

Le *Tableau XXIV* indique les résultats obtenus : les vasopressines du mouton et de la baleine ont pour chaque pH des mobilités identiques et comparables à celle de la vasopressine du bœuf. Elles sont révélées à la ninhydrine, au réactif de Gerngross et au réactif de Sakaguchi, sans que des impuretés puissent être décelées.

Tableau XXIV

Ionophorèse des vasopressines de mouton et de baleine
Comparaison avec la vasopressine de bœuf

(Cheminelements en mm vers la cathode mesurée par rapport
à la dinitrophényléthanolamine à divers pH)

	Vasopressine de bœuf	Vasopressine de mouton	Vasopressine de baleine
pH = 3,5 Acétate pyridine 0,06 M	113	-	113
pH = 4,0 Phosphate citrate 0,05 M	101	103	-
pH = 5,0 Acétate d'ammonium 0,05 M Acétate de pyridine 0,06 M	120 53	123	- 53
pH = 6,5 Acétate de pyridine 0,06 M Acétate de pyridine 0,06 M + urée 5 % sur Whatman N°4	71 73	71 -	72 73
pH = 8,5 Véronal-Véronal sodé 0,06 M Véronal-Véronal sodé 0,06 M + urée 5 % sur Whatman N°4	60 50	65 -	- 50

2) Chromatographie.

Les préparations de vasopressine sont soumises à des chromatographies de partage sur papier. Les solvants précédemment utilisés pour le contrôle des préparations d'ocytocine sont employés.

Les différents Rf obtenus sont comparables pour les vasopressines du cheval, du mouton, de la baleine et du bœuf, soit 0,35 pour le solvant butanol-acide acétique-eau et 0,47 pour le solvant butanol-acide acétique-pyridine-eau.

Les préparations apparaissent d'une homogénéité satisfaisante d'après ce critère.

B) COMPOSITION EN ACIDES AMINES

La composition en acides aminés des trois vasopressines étudiées a été déterminée par une méthode semi-quantitative (chromatographie sur papier) et par une méthode quantitative (passage sur colonne d'échangeur d'ions).

1) Composition semi-quantitative.

La détermination des acides aminés constituants est effectuée après une hydrolyse totale des vasopressines en utilisant : soit le procédé de chromatographie sur papier dans différents solvants, soit un combiné ionophorèse-chromatographie.

a) CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER :

On effectue d'une part une chromatographie dans le système butanol-acide formique et, d'autre part, une chromatographie bidimensionnelle : la première chromatographie dans le système butanol-acide formique étant suivie par une seconde dans le phénol saturé à l'aide d'un tampon 0,06 M à pH 4 ou pH 10.

Dans les vasopressines du cheval, du mouton et de la baleine, huit acides aminés sont présents en proportions approximativement équimoléculaires. Six existent dans l'ocytocine des mammifères : la cystine (Cys)₂, la glycine (Gly), l'acide aspartique (Asp), l'acide glutamique (Glu), la proline (Pro), la tyrosine (Tyr), et deux sont nouveaux : la phénylalanine (Phe) et l'arginine (Arg).

Cette composition est identique à celle de la vasopressine du bœuf.

b) IONOPHORÈSE-CHROMATOGRAPHIE :

Le combiné d'ionophorèse-chromatographie sur papier complète avantageusement la chromatographie bidimensionnelle précédemment décrite.

Un hydrolysate de vasopressine de baleine est soumis à une ionophorèse sur papier à pH 6,5 (tampon acétate de pyridine 0,06 M, 600 volts, pendant une heure). La feuille séchée est ensuite soumise à une chromatographie dans le système butanol-acide formique. On

sépare de cette façon les acides aminés constitutants en jouant sur leur différence de charges (acides neutres et basiques), puis sur leur différence de Rf.

On identifie $(\text{Cys})_2$, Asp, Glu, Gly, Pro, Arg, Tyr, Phe (fig. 10).

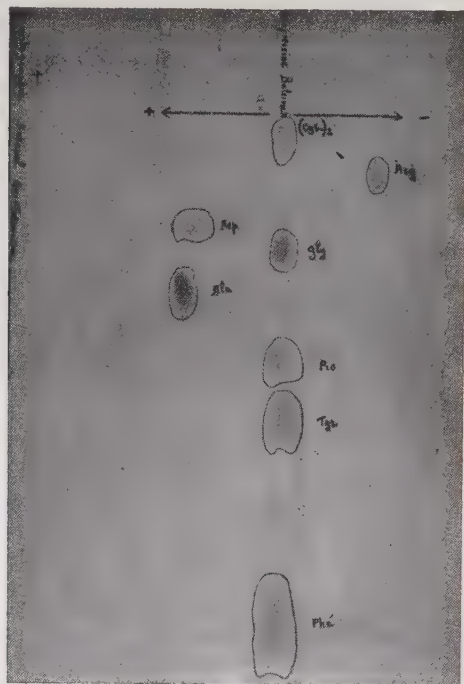


Figure 10
Composition en acides aminés
de la vasopressine de baleine

2) Composition quantitative.

La composition quantitative est déterminée par chromatographie sur échangeur d'ions à l'aide d'un auto-analyseur Spinco-Beckman, après hydrolyse totale de l'échantillon.

La présence d'arginine dans la molécule nécessite, d'une part une analyse des acides aminés neutres et acides sur la colonne prévue pour cet emploi et, d'autre part, une analyse par la petite colonne réservée à l'identification des acides aminés basiques.

Tableau XXV

Composition en acides aminés des vasopressines du bœuf, du mouton et de la baleine

Acide aminé	Vasopressine de bœuf		Vasopressine de mouton		Vasopressine de baleine		Nombre de résidus par molécule de Vasopressine
	Quantité d'acide aminé exprimée en μ mole	Rapport molaire l'acide glutamique étant pris comme unité	Quantité d'acide aminé exprimée en μ mole	Rapport molaire l'acide glutamique étant pris comme unité	Quantité d'acide aminé exprimée en μ mole	Rapport molaire l'acide glutamique étant pris comme unité	
Arg	0,062	1,03	0,130	0,94	0,436	0,97	1
Asp	0,063	1,02	0,140	1,02	0,397	0,88	1
Glu	0,058	1,00	0,137	1,00	0,449	1,00	1
Pro	0,073	1,20	0,131	0,93	0,510	1,13	1
Gly	0,071	1,20	0,138	1,00	0,438	0,86	1
Phe	0,055	0,99	0,126	0,91	0,424	0,83	1
1/2 (Cys) [*]	0,070	1,20	-	-	0,538	1,42	2
*CysO ₃ H	-	-	0,109	0,79	0,054	0,12	}
*Ser	0,017	0,29	0,016	0,14	0,017	0,04	
*Tyr	0,035	0,60	0,082	0,59	0,274	0,54	
							1

(*) La cystine est partiellement détruite au cours de l'hydrolyse. Parmi les produits de dégradation, on trouve de l'acide cystéique et de la sérine. La tyrosine est également en partie détruite, en raison de la présence de la cystine.

Les analyses quantitatives en acides aminés des vasopressines du mouton et de la baleine ont été déterminées et comparées à celle obtenue dans le cas de la vasopressine du bœuf.

Le *Tableau XXV* indique les résultats : les trois vasopressines ont des compositions quantitatives sensiblement identiques. Dans les trois cas, d'une part la cystine est partiellement dégradée et on retrouve de l'acide cystéique et de la sérine, d'autre part la tyrosine est également touchée en raison de la présence de cystine.

On peut attribuer à la vasopressine du mouton et à celle de la baleine la composition quantitative :



D'autre part, les activités moléculaires de ces préparations de vasopressines ont été calculées soit d'après les résultats donnés par l'analyse quantitative, soit sur la base d'un résidu de proline par molécule (résidu dosé par la méthode de CHINARD [94]). Elles sont de l'ordre de 500 à 700 unités par micromolécule.

C) STRUCTURE

Les vasopressines sont, d'après leur composition, des nonapeptides voisins de ceux des ocytocines et possèdent également un résidu de cystine. L'enchaînement des acides aminés constitutants a donc été étudié par des méthodes comparables à celles utilisées précédemment dans le cas des ocytocines. Toutefois, les vasopressines se distinguent par leur résidu d'acide aminé basique (arginine). La trypsine s'attaque spécifiquement à ce résidu et coupe quantitativement la chaîne à ce niveau. L'enchaînement C-terminal a été déduit des résultats obtenus après action de cet enzyme.

1) Oxydation par l'acide performique.

Les molécules de vasopressines possèdent un pont disulfure. La transformation de la cystine en deux résidus d'acide cystéique, par ouverture du pont, est obtenue à l'aide d'une oxydation par l'acide performique dans des conditions identiques à celles décrites pour les ocytocines. L'ionophorèse sur papier à pH 4 (tampon phosphate-citrate 0,05 M, 10 v/cm, 7 heures) du produit oxydé indique ici aussi la présence d'un seul peptide. Le cheminement est de 1,3 cm vers l'anode. L'oxydation ne scinde pas la molécule qui est donc constituée par une chaîne unique.

2) Enchaînements terminaux.

a) ENCHAINEMENT N-TERMINAL :

Le résidu d'acide aminé N-terminal des vasopressines oxydées du cheval, du mouton et de la baleine a été déterminé en appliquant la technique de SANGER [86].

Aucun DNP aminoacide n'a été identifié dans la fraction éthéro-soluble et dans la phase aqueuse acide le DNP-acide cystéique a été caractérisé par son Rf en chromatographie sur papier et son cheminement vers l'anode en ionophorèse à pH 4.

L'enchaînement N-terminal des vasopressines oxydées de cheval et de mouton a été établi en utilisant la méthode d'EDMAN [88]. Dans les deux cas, en opérant sur des quantités de vasopressine oxydée de l'ordre de 5 μ mole, on a obtenu :

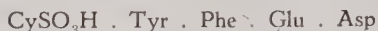


Dans le cas de la vasopressine de baleine, le procédé d'EDMAN modifié [87, 95] a été utilisé. Le principe et les différents stades de la technique sont identiques, mais les réactions au lieu d'être effectuées en phase liquide, se font à sec sur un support (papier). Cette microtechnique est plus sensible ; elle permet une étude de l'enchaînement N-terminal sur des quantités de l'ordre d'une μ mole.

Sur une bande de papier Whatman n° 1 (1 $\times$ 5 cm), on dépose en deux ou trois points 1 μ mole de vasopressine de baleine. Sur ces points, on ajoute 0,05 ml d'une solution de phénylisothiocyanate (20 % dans le dioxane). Le papier est alors suspendu dans une atmosphère de pyridine (5 ml), dioxane (5 ml), eau (5 ml) pendant trois heures à 40°. Le papier retiré est lavé par du benzène, puis par un mélange à parties égales d'alcool et d'éther. La bande de papier séchée est alors mise dans un dessiccateur où sont placés deux cristallisoirs contenant respectivement de l'acide acétique et de l'acide chlorhydrique concentrés. On laisse pendant dix-huit heures sous vide s'opérer la scission de la phénylthiohydantoïne formée. Le papier retiré, laissé à l'air pour dissiper les vapeurs d'acides, est lavé par le mélange alcool-éther qui permet l'extraction du PTH-aminoacide précédemment détaché. Dans cette phase organique, la phénylthiohydantoïne formée peut être identifiée directement par chromatographie sur papier et révélation spécifique, ou après régénération de l'acide aminé initial par hydrolyse acide.

La bande de papier traitée à nouveau par du phénylisothiocyanate est prête pour un nouveau cycle de réactions et pour la libération de l'acide aminé suivant sous forme de PTH-aminoacide.

L'ensemble des résultats donnés, d'une part par la technique de Sanger et, d'autre part, par la méthode d'Edman modifiée, a permis de déterminer les cinq premiers résidus de l'extrémité N-terminale de la vasopressine de baleine, soit :



b) ENCHAÎNEMENT C-TERMINAL :

La trypsine coupe quantitativement les chaînes peptidiques au niveau des carboxyles des acides aminés basiques : lysine et arginine. Les vasopressines du cheval, du mouton et de la baleine possèdent un résidu d'arginine dans leur enchaînement ; elles sont donc attaquables par cet enzyme et la chaîne peut être scindée en deux fragments : un fragment N-terminal contenant la base et un fragment C-terminal.

La composition en acides aminés de ces deux fragments a été déterminée et l'enchaînement C-terminal des vasopressines a été déduit d'après ces résultats.

0,2 μ mole de vasopressine du cheval non oxydée, dissous dans 0,05 ml de bicarbonate de soude à 0,025 p. 100 sont traités par 0,01 mg de trypsine dissous dans 0,01 ml d'eau distillée. On laisse dix-huit heures à 37°. Après inactivation de l'enzyme par ébullition de trois minutes, l'hydrolysate est examiné par chromatographie sur papier dans le système butanol-acide formique. On observe la présence d'une substance donnant avec la ninhydrine une coloration jaune qui passe au violet. Par hydrolyse, cette substance donne la glycine et, par électrophorèse sur papier, elle se comporte comme une substance basique qui peut être identifiée comme étant de la glycinamide par comparaison avec le témoin synthétique. La glycinamide occupe obligatoirement la position C-terminale. Compte tenu de la spécificité de la trypsine, l'enchaînement C-terminal est :



Nous trouvons pour les vasopressines du cheval, du mouton et de la baleine des enchaînements terminaux identiques à ceux de la vasopressine du bœuf.

3) Hydrolyse partielle acide.

7,2 μ mole de vasopressine sont hydrolysées par HCl 12 N pendant trois jours à 37°. L'hydrolysate est séparé en trois fractions acide, neutre et basique, dans un appareil à électrodialyse à quatre compartiments [96].

Les peptides de chaque fraction sont isolés par chromatographie sur papier Whatman n° 1 dans le solvant butanol-acide formique.

On identifie dans la fraction basique deux peptides différents (Pro, Arg) et (Pro, Arg, Gly).

Ces peptides réagissent tous deux avec l'isatine pour donner une coloration bleue. Cette réaction est spécifique de la proline [97] et indique que cet acide aminé occupe donc dans ces deux peptides une position N-terminale soit Pro . Arg et Pro . (Arg, Gly). Sachant que la glycynamide occupe une position C-terminale, ces peptides permettent d'établir l'enchaînement Pro . Arg . Gly (NH₂) (fig. 11).

Peptides	Méthodes
Arg.Gly(NH ₂)	Trypsine
Pro.Arg	Hydrolyse acide
Pro.Arg.Gly	"
(CySO ₃ H,Pro,Arg)	"
(Glu,Asp,CySO ₃ H)	"
(Phe,Glu)	"
(CySO ₃ H,Tyr)	"
CySO ₃ H.Tyr.Phe	Technique d'Edman
CySO ₃ H.Tyr.Phe.Glu.Asp.CySO ₃ H.Pro.Arg.Gly(NH ₂)	

Figure 11

Détermination de la structure de la vasopressine oxydée

Dans la fraction neutre, un seul tripeptide est identifié (CySO₃H, Pro, Arg). Il est neutre par compensation et permet de compléter l'enchaînement précédent :



D'autre part, dans la fraction acide, on identifie trois peptides (CySO₃H, Tyr), (Phe, Glu), (Glu, Asp, CySO₃H). En tenant compte de l'enchaînement N-terminal trouvé CySO₃H . Tyr . Phe, ces peptides permettent d'établir :



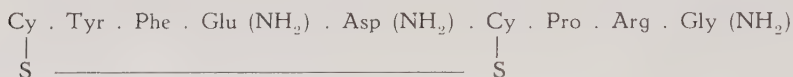
L'enchaînement complet de la vasopressine du cheval après oxydation est donc :



Nous trouvons un résultat identique pour la vasopressine du mouton. D'autre part, nous avons vu que les vasopressines du cheval, du mouton et de la baleine se comportent de façon identique à la vasopressine du bœuf au cours de l'ionophorèse sur papier et de la chromatographie sur colonne.

On en déduit que les résidus des acides aspartique et glutamique sont amidés dans les vasopressines du cheval, du mouton et de la baleine, comme ils le sont dans la vasopressine du bœuf.

Les deux résidus d'acide cystéique proviennent de la rupture du pont disulfure : la structure complète des vasopressines du cheval et du mouton est donc :



La vasopressine de baleine possède les mêmes extrémités N-terminale $\text{CySO}_3\text{H} \cdot \text{Tyr} \cdot \text{Phe} \cdot \text{Glu} \cdot \text{Asp}$ et C-terminale $\text{Arg} \cdot \text{Gly} (\text{NH}_2)$ que les vasopressines du bœuf, du cheval et du mouton. Etant donné la similitude des acides aminés centraux, on peut admettre que la structure complète de la vasopressine de baleine est identique à celle du cheval et du mouton.

D'après la nomenclature proposée par ACHER [93], la vasopressine est la $\text{Phe}^3\text{-Arg}^8$ -ocytocine, mais l'appellation arginine-vasopressine, proposée par DU VIGNEAUD, est la plus couramment utilisée. Ces deux substitutions par rapport à l'ocytocine modifient les activités pharmacologiques de ce peptide.

CHAPITRE III

Caractérisation de la vasotocine des vertébrés inférieurs

Dans la classe des mammifères, deux hormones : l'ocytocine et la vasopressine, ont été isolées chez toutes les espèces étudiées. La structure chimique de ces hormones est caractérisée par une chaîne peptidique de neuf résidus d'acides aminés avec un pont disulfure entre le résidu 1 et 6. Les variations de résidus s'effectuent au niveau des positions 3 et 8 de la chaîne.

D'après les résultats obtenus chez les vertébrés inférieurs, la présence d'au moins deux hormones a été mise en évidence chez les oiseaux, les batraciens et les poissons osseux. L'une d'entre elles, la « vasotocine », possède, comme son nom l'indique, des propriétés biologiques communes aux deux hormones précédemment décrites. La molécule a été isolée dans chaque espèce étudiée et la structure complète de l'hormone d'un poisson osseux a été déterminée. D'autre part, le produit naturel a été comparé du point de vue pharmacologique avec le produit de synthèse et avec les autres hormones neurohypophysaires.

A) STRUCTURE DE LA VASOTOCINE

1) Composition en acides aminés.

La composition semi-quantitative en acides aminés des différents produits isolés : vasotocine de poulet, de grenouille, de tacaud et de lieu noir, a été déterminée par chromatographie sur papier. Cette étude a été complétée dans le cas de la vasotocine du lieu noir par une analyse quantitative des acides aminés sur échangeur d'ions.

Après l'hydrolyse totale du peptide (HCl 6 N, 100°, 20 H), les acides aminés présents ont été identifiés par leur Rf dans différents systèmes solvants de chromatographie. L'intensité des taches données par chacun des acides aminés, après révélation à la ninhydrine, est évaluée par rapport à une gamme témoin d'acides aminés [82].

Dans le solvant butanol-acide formique, on observe la présence de cystine (Cys)₂, d'arginine (Arg), de proline (Pro), de tyrosine (Tyr) et d'une des leucines. On note l'absence de phénylalanine. Par chromatographie dans le solvant butanol tamponné à pH 4, on identifie la présence d'un résidu d'isoleucine (ILeu) et on constate l'absence de leucine.

Par chromatographie bidimensionnelle (la première chromatographie dans le solvant butanol-acide formique est suivie d'une seconde dans le solvant phénol saturé par un tampon pH 4), on caractérise la glycine (Gly), l'acide aspartique (Asp) et l'acide glutamique (Glu) en confirmant la présence d'arginine (Arg).

Dans le cas de la vasotocine du lieu noir, un échantillon hydrolysé sous vide a été soumis à une analyse quantitative des acides aminés par la méthode de SPACKMAN, STEIN et MOORE [84] à l'aide d'un autoanalyseur Spinco-Beckman. Cette analyse est effectuée en deux stades : on effectue tout d'abord une analyse des acides aminés neutres et acides présents sur la colonne réservée à cet effet, puis une analyse de l'arginine sur une colonne permettant d'identifier les résidus d'acides aminés basiques.

Le *Tableau XXVI* indique les résultats obtenus. L'arginine, les acides aspartique et glutamique, la glycine, la proline et l'isoleucine peuvent être considérés comme étant en quantité équimoléculaire. Pour compléter cette analyse, rendue délicate par la dégradation de la cystine au cours de l'hydrolyse, une composition quantitative a été effectuée après oxydation de la molécule par l'acide performique. Le *Tableau XXVI* montre qu'après oxydation, la cystine a totalement disparu, elle est transformée sensiblement en deux résidus d'acide cystéique. La tyrosine, déjà touchée dans la première analyse, a été en majeure partie détruite au cours de cette oxydation.

La composition quantitative résultant de ces deux analyses est la suivante :



Elle permet en outre de calculer l'activité moléculaire de la vasotocine : 500 U par μ mole, calculée en activité vasopressique.

Cette composition en acides aminés est identique pour l'hormone isolée du poulet, de la grenouille et des poissons téléostéens. Elle est intermédiaire entre celle de l'ocytocine et celle de l'arginine-vaso-

Tableau XXVI

Composition en acides aminés de la vasotocine du lieu noir

Acide aminé	Vasotocine de Lieu		Vasotocine de Lieu après oxydation par l'acide performique		Nombre de résidus par molécule de vasotocine
	Quantité d'acide aminé exprimée en μ mole	Rapport molaire l'acide aspartique étant pris comme unité	Quantité d'acide aminé exprimée en μ mole	Rapport molaire l'acide aspartique étant pris comme unité	
Arg	0,104	1,08			1
Asp	0,096	1,00	0,156	1,00	1
Glu	0,072	0,75	0,158	1,01	1
Pro	0,126	1,31	0,197	1,26	1
Gly	0,100	1,04	0,210	1,34	1
lLeu	0,067	0,69	0,097	0,62	1
Tyr*	0,050	0,52	0,017	0,10	1
1/2(Cys) ₂	0,125	1,30	—	—	} 2
CySO ₃ H	0,070	0,72	0,253	1,62	
Ser	0,023	0,24	0,043	0,27	—
Leu	0,004	0,03	0,023	0,14	—
Val	—	—	0,016	0,10	—
Ala	0,012	0,12	0,037	0,23	—

(*) La tyrosine partiellement détruite au cours de l'hydrolyse a été fortement dégradée lors de l'oxydation par l'acide performique de la molécule.

pressine des mammifères. Cette hormone a, en effet, sept acides aminés sur huit communs avec chacune d'elles.

Cette composition est de plus identique à celle de l'arginine-vasotocine synthétique.

2) Structure.

a) ENCHAÎNEMENTS TERMINAUX :

L'étude des enchaînements terminaux a été réalisée sur le peptide isolé des poissons téléostéens (tacaud, lieu) par voie chimique et enzymatique.

— Enchaînement N-terminal :

Le résidu d'acide aminé N-terminal a été identifié en appliquant la méthode de SANGER [86] sur la molécule oxydée. L'enchaînement N-terminal a été déduit de l'action de la leucine amino-peptidase sur cette même extrémité.

Le DNP-amino-acide N-terminal a été isolé suivant la technique utilisée dans le cas des ocytocines. Une quantité de vasotocine de lieu correspondant à 150 u en activité vasopressique est oxydée au moyen de l'acide performique afin de transformer le résidu de cystine en deux résidus d'acide cystéique. Le peptide oxydé est soumis à l'action du dinitrofluorobenzène en milieu alcalin. Après une hydrolyse acide de huit heures à 100° du DNP-peptide, on n'obtient aucun DNP-aminoacide éthersoluble.

Dans la phase aqueuse, on peut facilement identifier le DNP-aminoacide de l'acide cystéique : par son Rf en chromatographie sur papier dans le système butanol-acide acétique-eau (Rf = 0,38) et par son cheminement après ionophorèse sur papier (pH 4, 1/2 h, 1.000 V) identique à celui du DNP-CySO₃H synthétique (76 mm vers l'anode).

D'après la technique de SANGER, l'extrémité N-terminale de la vasotocine du lieu noir oxydée est donc constituée par un résidu d'acide cystéique.

A partir de l'extrémité N-terminale, les résidus d'acides aminés peuvent être détachés de façon récurrente soit en utilisant une technique chimique (méthode d'EDMAN), soit en effectuant une attaque enzymatique. Cette dernière méthode présente l'avantage de nécessiter beaucoup moins de matériel. Dans ce cas, on fait appel à la leucine amino-peptidase. Cet enzyme, isolé du rein de porc, a la propriété de détacher un à un les résidus à partir de l'extrémité N-terminale d'une chaîne peptidique à condition que le groupement aminé terminal soit libre [98]. Suivant le temps d'action, la libération des acides aminés peut se poursuivre plus ou moins intensément à partir de cette extrémité.

On a donc fait agir la leucine-aminopeptidase sur une quantité de vasotocine du tacaud correspondant à 210 unités en activité vasopressique. Les conditions optima sont obtenues lorsqu'on fait une attaque de quinze heures à 40°, le pH étant ajusté à 8,5 par de la triméthylamine et la concentration d'enzyme comprise entre 30 et 100 µg. La réaction enzymatique est arrêtée par élimination rapide de la triméthylamine en dessiccateur en présence d'acide sulfurique.

Par chromatographie sur papier dans le système butanol-acide formique et dans le solvant butanol tamponné à pH 4, on observe une libération nette de tyrosine et d'isoleucine. Le temps d'attaque exceptionnellement long suggère qu'un empêchement particulier s'exerce ici. En effet, une molécule de 29 résidus d'acides aminés comme le glucagon peut être entièrement hydrolysée en sept heures par cet enzyme [99]. Des expériences de contrôle ont été effectuées avec des molécules de structure connue.

Si on fait agir dans les mêmes conditions la leucine aminopeptidase sur 0,2 μ mole d'ocytocine du mouton, on observe aussi une libération de tyrosine et d'isoleucine, la demi-cystine N-terminale libérée reste accrochée par le pont disulfure.

Lorsque la leucine-aminopeptidase agit dans le même temps sur 0,2 μ mole de vasopressine du cheval ou de la baleine, la tyrosine et la phénylalanine sont libérées.

Les résultats obtenus par la technique de SANGER et ceux établis après action de la leucine-aminopeptidase permettent de déterminer l'extrémité N-terminale de la vasotocine :



— *Enchaînement C-terminal* :

La carboxypeptidase A est normalement utilisée pour étudier cette extrémité de la chaîne ; cependant sans action sur l'ocytocine et la vasopressine, elle n'agit pas non plus sur la vasotocine. Ce peptide possède, comme la vasopressine, un résidu d'arginine ; la séquence C-terminale est donc déduite des résultats obtenus après une coupure tryptique de la chaîne.

Le peptide résidu obtenu après attaque de la leucine-aminopeptidase est hydrolysé par la trypsine à 37° durant quatre heures.

Par chromatographie sur papier dans le solvant butanol-acide formique, on identifie la glycnamide. La vasopressine de la baleine donne dans ces conditions la même tache jaune au même niveau après révélation à la ninhydrine. Dans le cas de l'ocytocine, aucun acide aminé n'est libéré, cette molécule ne contenant pas de résidu basique.

L'extrémité C-terminale de la vasotocine est donc :



L'extrémité N-terminale de la vasotocine est donc identique à celle de l'ocytocine et l'extrémité C-terminale est identique à celle de l'arginine-vasopressine.

b) HYDROLYSE PARTIELLE ACIDE :

Une quantité de vasotocine oxydée correspondant à 50 u en activité vasopressique a été soumise à une hydrolyse par l'acide chlorhydrique 11,2 N pendant trois jours, à 37°.

Les peptides résultant de cette hydrolyse partielle ont été isolés après une électrophorèse sur papier de une heure à pH 3,5 tampon acétate de pyridine, suivie d'une chromatographie dans le système butanol-acide acétique-eau.

Les peptides (Pro, Arg), (CySO₃H, Pro, Arg, Gly), (lLeu, Glu), (Asp, CySO₃H) ont été identifiés.

Etant donné les résultats déjà obtenus, d'une part pour l'extrémité N-terminale CySO₃H . Tyr . lLeu et, d'autre part, pour l'extrémité C-terminale Arg . Gly (NH₂), on peut déduire les enchainements (fig. 12) :

CySO₃H . Tyr . lLeu . Glu et Asp . CySO₃H . Pro . Arg . Gly (NH₂)

Figure 12

Détermination de la structure de la vasotocine oxydée

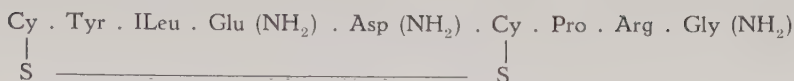
P e p t i d e s	Méthodes
Arg.Gly(NH ₂)	Trypsine
(Pro,Arg)	Hydrolyse partielle acide
(CySO ₃ H,Pro,Arg,Gly)	"
(Asp,CySO ₃ H)	"
(lLeu,Glu)	"
CySO ₃ H	Technique de Sanger
CySO ₃ H.Tyr.lLeu	Leucine amino-peptidase
CySO ₃ H.Tyr.lLeu.Glu.Asp.CySO ₃ H.Pro.Arg.Gly(NH ₂)	

L'enchainement complet de la vasotocine après oxydation est donc :

CySO₃H . Tyr . lLeu . Glu . Asp . CySO₃H . Pro . Arg . Gly (NH₂)

Les deux résidus d'acide cystéique proviennent de la rupture du pont disulfure. Comme l'ocytocine et la vasopressine, la vasotocine possède donc un pont S-S entre les résidus 1 et 6. Par analogie avec ces deux hormones, d'après les résultats obtenus avec la leucine aminopeptidase, on peut admettre que les deux résidus d'acide glutamique et aspartique sont amidés.

La structure de la vasotocine est donc :



Cette structure est identique à celle de l'arginine-vasotocine synthétisée par DU VIGNEAUD.

Les peptides isolés du poulet et de la grenouille présentent une composition en acides aminés identique à celle de la vasotocine des poissons osseux. On peut admettre qu'ils possèdent la même structure, les propriétés biologiques étant identiques.

B) PROPRIETES BIOLOGIQUES DE LA VASOTOCINE

1) Comparaison du produit naturel et du produit synthétique.

La vasotocine isolée du poulet, de la grenouille et des poissons téléostéens possède plusieurs activités biologiques. Parmi celles-ci, quatre sont particulièrement bien connues, ayant été souvent déterminées. Ce sont : l'activité vasopressique sur le rat, l'activité ocytocique sur l'utérus de rate, l'activité hydroosmotique mesurée sur la vessie de grenouille et l'activité natriférique.

La *figure 13* indique les valeurs de l'activité ocytocique, vasopressique et hydroosmotique obtenues pour la vasotocine du tacaud. Ces mesures toutes faites par rapport au standard international, permettent de déduire les rapports de ces trois activités biologiques. L'activité hydroosmotique est de beaucoup la plus élevée. La vasotocine ayant une action plus marquée sur des organes récepteurs de batraciens, on peut penser qu'elle joue un rôle physiologique chez ces vertébrés.

Ce profil pharmacologique peut être comparé à celui obtenu avec la molécule synthétique. La vasotocine a été synthétisée par KATSOYANNIS et DU VIGNEAUD [73] d'une part, et par HUGUENIN et BOISSONNAS [100] d'autre part. La comparaison a été effectuée avec le produit préparé par KATSOYANNIS et DU VIGNEAUD. L'activité ocytocique sur l'utérus de rate a alors été prise comme base de comparaison ; on détermine le rapport des trois autres activités principales à l'activité ocytocique.

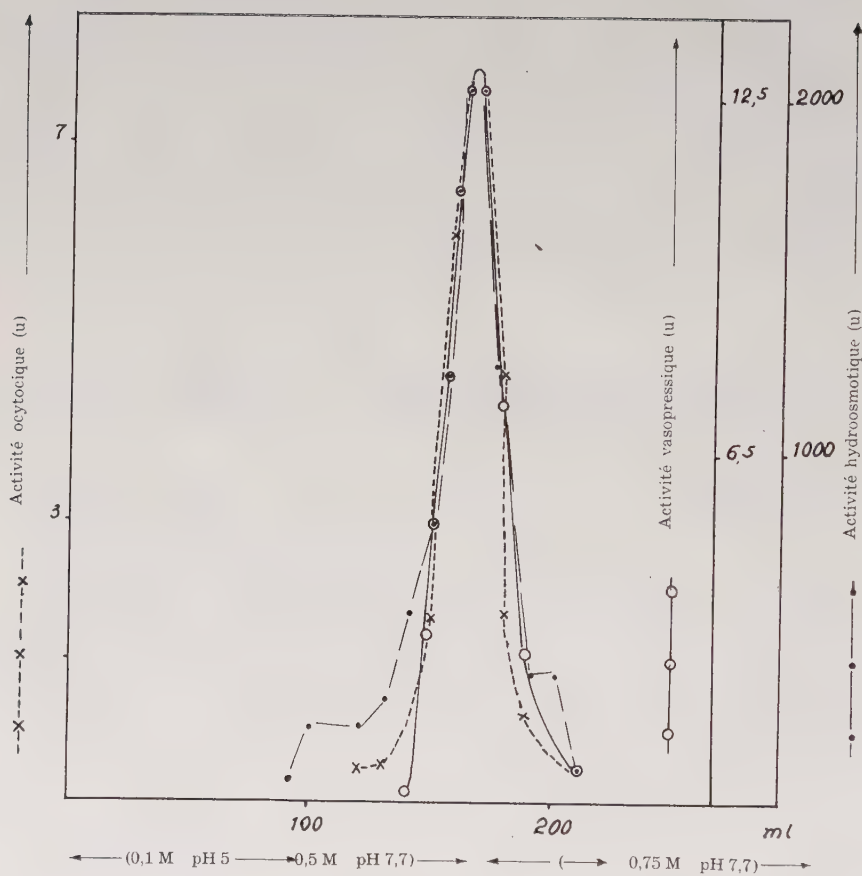


Figure 13 : Vasotocine de tacaud

Activités ocytocique, vasopressique et hydroosmotique de la vasotocine de tacaud après chromatographie sur Amberlite IRC 50

Ainsi le rapport :

Activité vasopressique

Activité ocytocique

est, comme le montre le *Tableau XXVII*, de 1,65 pour le produit synthétique [73]. Il varie de 1,5 à 1,65 pour le produit isolé des poissons téléostéens.

Tableau XXVII

Activités biologiques comparées de la vasotocine synthétique
et de quelques vasotocines naturelles

R a p p o r t des activités	Vasotocine synthétique	Vasotocine de poissons		
		T a c a u d	L i e u	M e r l u
A.vasopressique (par rapport à) A.ocytcique	1,65	1,65	1,60	1,50
A.hydroosmotique (par rapport à) A.ocytcique	270	250	-	300

L'activité ocytocique (rate) a été prise comme base de comparaison

MUNSICK et al. [28] indiquent que le rapport:-

Activité hydroosmotique

Activité ocytocique

est de 270 pour le produit synthétique. D'après les mesures de JARD et al. [42], il serait de l'ordre de 185. Nous avons obtenu des valeurs de 250 à 300 pour le produit naturel.

Le rapport :

Activité natriférique

Activité ocytocique

trouvé par JARD et al. [42] pour le produit synthétique est de 15. Des déterminations faites sur la vasotocine de grenouille par MOREL et al. [101] donnent le même rapport.

Le produit naturel possède donc des activités relatives comparables à celles du produit synthétique. Néanmoins, les activités abso-

lues semblent plus élevées dans le cas du produit naturel. En effet, la vasotocine naturelle possède une activité vasopressique micromoléculaire de l'ordre de 500 u. La molécule synthétisée par KATSOYANNIS et DU VIGNEAUD [73] possède une activité vasopressique de 125 unités par micromole. Récemment, HUGUENIN et BOISSONNAS [100] ont amélioré la synthèse, ce qui permet d'obtenir un produit possédant une activité vasopressique de 250 u par micromolécule.

2) Comparaison avec les activités des autres hormones.

La vasotocine se présente comme un hybride moléculaire de l'ocytocine dont elle possède la partie cyclique et de l'arginine-vasopressine dont elle a la chaîne latérale. Cette structure lui confère des propriétés biologiques qui la rapprochent de ces deux hormones.

Le *Tableau XXVIII* permet de faire quelques comparaisons.

La vasotocine possède, comme l'ocytocine, une activité lactagogue et une activité ocytocique sur l'utérus de rate. Elle est comparable à une vasopressine par son activité antidiurétique et son activité vasopressique. Elle se distingue cependant de ces deux hormones par ses activités hydroosmotique et natriférique qui sont beaucoup plus élevées.

La répartition de cette hormone semble très largement étendue chez les vertébrés inférieurs, comme le montrent de nombreux travaux qui, pour la plupart, s'appuient sur des données pharmacologiques.

Isolée chez le poulet, la vasotocine a été décelée chez un autre oiseau : le pigeon [27]. De même, elle semble être présente chez le crapaud [27].

SAWYER [102] a trouvé chez la tortue (*Chelonia mydas*) et le caïman des profils pharmacologiques explicables par la présence de vasotocine dans les extraits.

Un plus grand nombre d'études ont porté sur les principes actifs contenus dans les hypophyses de poissons [80]. HELLER [27] a partiellement purifié et a identifié la vasotocine du lieu. RASMUSSEN et CRAIG [103] ont d'autre part obtenu l'isolement de la vasotocine du *Merluccius vulgaris* en employant une méthode de distribution à contre-courant suivie de chromatographie sur Sephadex G25.

L'existence de la vasotocine a été suggérée chez les cyclostomes [80]. Par contre, de nombreux auteurs : HELLER et al. [27], PERKS et al. [44], SAWYER et al. [80] pensent que les Elasmobranches possèdent une hormone différente.

Activités biologiques des hormones neurohypophysaires
en u par mg

	Tests mammifères				Tests oiseaux		Tests batraciens	
	Δ. ocytocine (rate)	Δ. pressique (rat)	Δ. lactagogue (lapine)	Δ. anti- diurétique (chien)	Δ. ocytocine (poule)	Δ. dépressive (coq)	Δ. hydro- osmotique (grenouille)	Δ. natrifique
Ocytocine (mammifères)	500	7	600	3	35	500	500	500
Lysine Vasopressine (porc, hippopotame)	4	300	66	45	23	48	13,5	8
Arginine Vasopressine (mammifères)	50	600	100	600	480	85	80	20
Arginine Vasotocine (poulet, grenouille, poissons osseux)	75	125	155	100	1.280	150	14.000	1.100

Les valeurs indiquées pour l'ocytocine, la lysine-vasopressine et l'arginine-vasopressine concernent des produits naturels et sont calculées d'après VAN DYKE et coll. [17] pour les tests mammifères et d'oiseaux, d'après JARD et al. [42] pour les tests batraciens. Les valeurs indiquées pour l'arginine-vasotocine concernent un produit synthétique et sont calculées d'après KATSOYANNIS et du VIGNEAUD [73] et MUNSICK et al. [28] pour les tests mammifères et d'oiseaux, et d'après JARD et al. [42] pour les tests batraciens.

Une étude chimique approfondie doit donc vérifier les hypothèses formulées en ce qui concerne les Reptiles, les Elasmobranches et les Cyclostomes.

Au cours de ce travail d'isolement des hormones neurohypophysaires de quelques vertébrés, trois hormones différentes ont pu être identifiées : l'ocytocine, la vasopressine et la vasotocine.

Le *Tableau XXIX* donne les structures de ces trois peptides.

Tableau XXIX

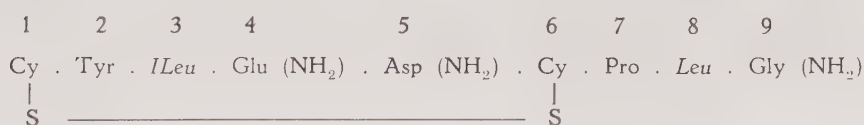
Structure des trois hormones neurohypophysaires isolées

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ocytocine	Cy .	Tyr .	ILeu .	Glu (NH ₂) .	Asp (NH ₂) .	Cy .	Pro .	Leu .	Gly (NH ₂)
	S	—————				S			
Vasopressine	Cy .	Tyr .	Phe .	Glu (NH ₂) .	Asp (NH ₂) .	Cy .	Pro .	Arg .	Gly (NH ₂)
	S	—————				S			
Vasotocine	Cy .	Tyr .	ILeu .	Glu (NH ₂) .	Asp (NH ₂) .	Cy .	Pro .	Arg .	Gly (NH ₂)
	S	—————				S			

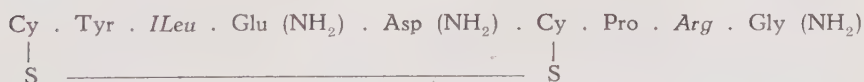
**RELATIONS ENTRE LA STRUCTURE
ET LES ACTIVITES BIOLOGIQUES**

Adaptation de la structure aux activités biologiques chez les mammifères

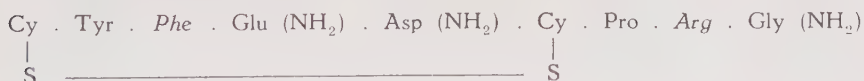
Les hormones neurohypophysaires possèdent une parenté chimique frappante. Comme il a déjà été énoncé, l'ocytocine peut être prise comme structure de référence de cette famille de peptides actifs [93].



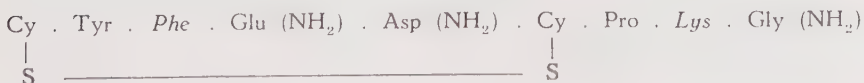
La vasotocine dérive de cette structure par une substitution en position 8 :



et les vasopressines par des substitutions en position 3 et 8 :



(*Arginine-vasopressine*)



(*Lysine-vasopressine*)

Ces hormones se manifestent chez les mammifères par diverses activités biologiques : activité ocytocique, activité lactagogue, activité antidiurétique et activité vasopressique ; elles se différencient par leur degré d'action. L'ocytocine se caractérise par des activités ocytocique et lactagogue très élevées. Les vasopressines, par contre, ont principalement une action antidiurétique et vasopressique. Des relations entre l'activité hormonale et certaines particularités structurales peuvent être mises en évidence. L'introduction d'un résidu basique en position 8 à la place du résidu de leucine dans la structure de l'ocytocine atténue les propriétés ocytocique et lactagogue de la molécule, mais augmente les activités vasopressique et antidiurétique. La vasotocine possède en effet les quatre activités principales de cette famille d'hormones et sa structure est biologiquement la plus polyvalente. Une substitution supplémentaire en position 3 (un résidu de phénylalanine remplaçant le résidu d'isoleucine) maintient les activités antidiurétique et vasopressique de la vasotocine, mais se traduit par une nette diminution des activités ocytocique et lactagogue. Les variations des propriétés biologiques des hormones naturelles sont donc la conséquence de modifications de structure apparaissant en des positions précises. Du VIGNEAUD et ses collaborateurs d'une part, BOISSONNAS et son groupe d'autre part, ont alors essayé de déterminer si par des substitutions, des additions, des soustractions de résidus réalisées dans l'enchaînement de l'ocytocine, il était possible d'obtenir des peptides plus actifs ou plus spécifiques.

La synthèse des hormones naturelles a, en effet, ouvert la voie à la synthèse d'analogues et sur les 712 milliards de combinaisons réalisables avec 9 résidus, une cinquantaine ont été étudiées jusqu'à ce jour. La plupart de ces analogues concernent des substitutions que la nature serait capable de réaliser. L'arginine-vasotocine en est un exemple : elle a été synthétisée avant d'être découverte chez les vertébrés inférieurs. Certains analogues présentent des anomalies structurales qui peuvent être considérées comme des modifications artificielles. Ainsi DU VIGNEAUD et al. [105] ont montré que l'introduction d'un résidu sarcosine en position 9 de l'ocytocine ou de la lysine-vasopressine [106] diminue considérablement les activités de ces deux hormones.

À l'aide de cette série d'analogues, nous allons étudier tout d'abord l'importance relative de chaque position, puis l'influence de tout raccourcissement ou de tout allongement de la chaîne, sur les activités biologiques des mammifères.

1) Importance des positions.

L'importance de chaque position peut être évaluée par le plus ou moins grand nombre de substitutions réalisables sans perte totale d'activité hormonale.

Les substitutions peuvent se situer soit dans la partie cyclique de la molécule (positions 2, 3, 4, 5), soit sur la chaîne latérale (positions 7, 8, 9).

Les principales substitutions réalisées sont classées dans le *Tableau XXX*. Ce tableau indique les activités biologiques chez les mammifères de chacun des analogues de l'ocytocine. Il est à noter que les deux activités principales de l'ocytocine : activité ocytocique et activité lactagogue, peuvent être différemment modifiées par un même substituant. En général, l'activité lactagogue est moins diminuée. Nous voyons par l'examen de ce *Tableau XXX* que :

— En position 1, aucune substitution de résidu n'a encore été tentée. DU VIGNEAUD et al. [114] ont simplement étudié l'importance du groupement aminé terminal en synthétisant la désaminoocytocine (1 β mercapto-propionique-ocytocine) qui apparaît plus active que l'hormone naturelle.

— Peu d'analogues présentant des modifications en position 2 ont été synthétisés. La phénylalanine peut remplacer la tyrosine : la Phe²-ocytocine conserve une part de l'activité hormonale de l'ocytocine, l'activité lactagogue étant moins abaissée que l'activité ocytocique.

La Ser²-ocytocine montre qu'en position 2 les substitutions sont très vite incompatibles avec l'activité biologique.

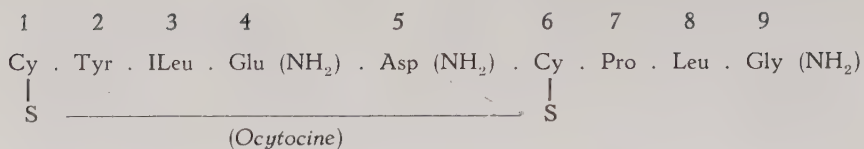
— En position 3, de plus amples modifications sont possibles sans perte totale de ces activités biologiques. L'activité lactagogue devient plus élevée que l'activité ocytocique dans la Val³-ocytocine, la Leu³-ocytocine et la Phe³-ocytocine, mais représente seulement le 1/3 ou le 1/10^e de celle de l'ocytocine. La Phe³-ocytocine possède en outre une faible activité antidiurétique.

La Phe³-ocytocine a un cycle analogue à celui des vasopressines et une chaîne latérale identique à celle de l'ocytocine. Ainsi la phénylalanine semble le résidu qui en position 3 soit le plus approprié à l'activité antidiurétique.

Les substitutions possibles en position 3 sont cependant limitées, comme le montrent les analogues : Tyr³-ocytocine et Try³-ocytocine.

— La position 4, d'après l'analogue Asp (NH₂)⁴-ocytocine, paraît assez modifiable. En effet Asp (NH₂)⁴-ocytocine conserve une impor-

Tableau XXX
Analogues de l'ocytocine



A n a l o g u e	Autre nom	Activité ocytocique	Activité lactagogue	Activité vasopressique	Activité anti- diurétique	Références
		(rate) (u/ μ mole)	(lapine) (u/ μ mole)	(rat) (u/ μ mole)	(rat) (u/ μ mole)	
Ocytocine		500	600	7	3	N
en 2						
Phe ² -Ocytocine		32	141	0,4	0,5	107
Ser ² -Ocytocine		0,01	0,01	0,01	0,01	"
en 3						
Val ³ -Ocytocine	Valyl ocytocine	59	207	0,2	0,8	"
Leu ³ -Ocytocine		45	101	0,3	0,2	"
Phe ³ -Ocytocine	Oxypressine	20	60	3	30	"
Tyr ³ -Ocytocine		0,1	1,5	0,01	-	"
Try ³ -Ocytocine		0,04	0,1	0,01	-	"
en 4						
lGlu (NH ₂) ⁴ -Ocytocine	Isoglutamine ocytocine	0,01	-	0		108
Asp (NH ₂) ⁴ -Ocytocine		108	300	0,13	0,04	109
en 5						
lAsp (NH ₂) ⁵ -Ocytocine	Isoasparagine ocytocine	0	-	0	-	110
Glu (NH ₂) ⁵ -Ocytocine		1	7,3	0,01	-	109
en 8						
lLeu ⁸ -Ocytocine		289	328	6,3	1,1	107
Val ⁸ -Ocytocine		200	310	9	0,8	"
Lys ⁸ -Ocytocine	Lysine vasotocine	78	180	130	24	112
Arg ⁸ -Ocytocine	Arginine vasotocine	155	210	245	250	73-100
en 3-8						
Phe ³ -Lys ⁸ -Ocytocine	Lysine vasopressine	4	66	300	250	N
Phe ³ -Arg ⁸ -Ocytocine	Arginine vasopressine	50	100	600	600	N
Phe ³ -His ⁸ -Ocytocine	Histidine vasopressine	1,5	-	1,5	-	113
Tyr ³ -Lys ⁸ -Ocytocine		0,01	0,2	1,6	0,18	107
Try ³ -Lys ⁸ -Ocytocine		0,01	-	-	-	"
Ser ³ -Lys ⁸ -Ocytocine		0,01	-	-	-	"
en 2-3-8						
Phe ² -Phe ³ -Lys ⁸ -Ocytocine		0,3	2,5	55	20	100
Phe ² -Phe ³ -Arg ⁸ -Ocytocine		0,2	3	122	350	"
Phe ² -Tyr ³ -Cys ⁸ -Ocytocine		0,01	-	0,14	0,013	107

tante partie des activités biologiques de l'ocytocine. Par contre, IGlu (NH₂)⁴-ocytocine est non seulement inactif mais encore présente un effet antagoniste vis-à-vis des substances à activité vasopressique. Cette substitution d'une isoglutamine à la glutamine entraîne un allongement du cycle (qui renferme alors 22 carbones) qui pourrait expliquer la perte de l'activité biologique de cet analogue.

— La position 5 a été peu étudiée. Elle paraît ne pas supporter de substitution. Les deux essais tentés ont donné des peptides dépourvus des activités hormonales de l'ocytocine.

— En position 8, il semble qu'une assez grande liberté soit permise en ce qui concerne les activités ocytocique et lactagogue. Les analogues ILeu⁸-ocytocine et Val⁸-ocytocine sont les peptides les plus actifs du point de vue des activités ocytocique et lactagogue, après l'ocytocine naturelle. Cette position 8 est capitale pour les activités vasopressique et antidiurétique. L'introduction d'un résidu basique en position 8 fait apparaître ces deux activités, comme le montrent Lys⁸-ocytocine et Arg⁸-ocytocine, sans toutefois faire disparaître les activités ocytocique et lactagogue. La vasotocine est un de ces analogues.

Lorsque les substitutions se multiplient sur la chaîne, elles cumulent leurs effets. Les analogues possédant des substitutions en 2 et en 3 sont pratiquement dépourvus de toute activité hormonale.

Il en est de même lorsque les modifications ont lieu en 2 et en 8. Par exemple, la Phe²-Arg⁸-ocytocine synthétisée par BOISSONNAS et al. [100] possède des activités vasopressique et antidiurétique qui sont la moitié de celles de la vasotocine et les activités lactagogue et ocytocique ne sont plus que le dixième de celles de la vasotocine.

Les substitutions en 3 et en 8 sont trouvées dans la nature dans le cas des vasopressines. Les activités antidiurétique et vasopressique sont conservées malgré l'apparition d'un résidu de phénylalanine en position 3. Les conditions optimales pour ces deux activités sont trouvées dans Phe³-Arg⁸-ocytocique (vasopressine). Les autres substitutions en 3 et en 8 sont inopérantes et des analogues même assez voisines des vasopressines ont perdu toute activité biologique.

Si on considère, d'une part l'activité lactagogue et, d'autre part l'activité antidiurétique, qui sont probablement les deux activités physiologiques chez les mammifères, quelques modifications structurales sont possibles, sans altération complète de l'activité biologique. Pour l'activité lactagogue, ce sont les positions 3, 4 et 8 qui peuvent subir quelques modifications. En position 2, on ne peut remplacer la tyrosine que par un résidu de phénylalanine ; quant à la position 5, elle semble difficile à modifier. En ce qui concerne l'activité antidiurétique, les possibilités de modification sont encore plus réduites. En

position 2, la phénylalanine peut remplacer la tyrosine et, en position 3, seuls sont possibles un résidu de phénylalanine ou un résidu d'isoleucine. D'autre part, un résidu basique est nécessaire en position 8 et de sa charge dépend le degré d'activité antidiurétique.

2) Importance de la longueur de la chaîne.

Les effets sur les activités biologiques chez les mammifères des raccourcissements possibles de la chaîne latérale et de certains allongements de la partie cyclique ont été étudiés afin de connaître l'importance de la longueur de la chaîne peptidique.

a) CHAÎNE LATÉRALE :

Divers analogues présentant des raccourcissements de la chaîne latérale ont été synthétisés.

On a successivement éliminé les résidus 9, 8 ou 7 [115] ou les trois ensemble [116]. Les mêmes résultats ont été obtenus : les activités biologiques de ces analogues ne sont plus que le 1/150^e des activités de l'ocytocine. La chaîne latérale a donc une grande importance pour le maintien des activités biologiques non seulement par la nature des substitutions, mais par sa longueur elle-même.

b) CYCLE :

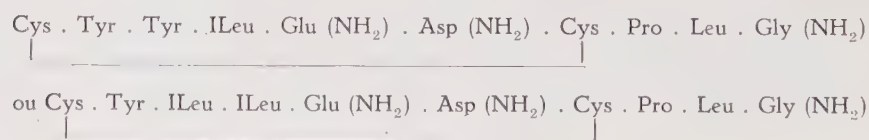
Les allongements de la chaîne ont été effectués en modifiant la longueur de la partie cyclique.

Cet allongement peut être provoqué par un allongement proprement dit du cycle grâce à l'introduction d'un résidu supplémentaire, ou par un allongement du pont dû à l'addition d'un carbone supplémentaire ou bien à l'ouverture de ce pont.

— Allongement du cycle :

Certains analogues présentent une addition de résidu sur l'extrémité N-terminale, telle la N-glycyloctocine [117] ou la N-acétyloctocine [107]. Ces deux substances ne possèdent plus que le 1/250^e des activités ocytocique et lactagogue de l'ocytocine.

D'autres analogues possèdent un résidu supplémentaire, de telle sorte que le pont disulfure devient 1-7. Ainsi par exemple :



Ces deux analogues [107] ne présentent aucune activité biologique et le premier est même un antagoniste de l'activité ocytotique de l'ocytocine.

— *Allongement du pont :*

La partie cyclique de l'ocytocine est constituée par un cycle de 20 atomes de carbone. Un motif structural de même taille se retrouve dans la chaîne A (pont intrachaine) de l'insuline. La longueur de ce cycle pouvait donc sembler importante et en relation directe avec l'activité biologique.

Du VIGNEAUD et ses collaborateurs ont étudié cet aspect du problème. Ils ont synthétisé l'hémihomocystine-ocytocine [118] qui renferme un cycle de 21 carbones et ils ont constaté que l'activité ocytotique de cet analogue n'est plus que de 0,75 u/mg.

D'autre part, plusieurs auteurs ont étudié les effets de la réduction du pont disulfure. AUDRAIN et CLAUSER [119] ont traité de la pitocin (ocytocine commerciale) par de la cystéine et ont déterminé l'activité biologique de l'ocytocine réduite par une méthode de dosage anaérobie, étant donné que le pont disulfure peut se reformer spontanément sous l'influence de l'oxygène moléculaire. Ils ont observé une diminution de 80 % de l'activité initiale et la restauration d'une majeure partie de cette activité après réoxydation à l'air ou par l'eau oxygénée.

La réduction du pont disulfure de l'ocytocine provoque donc la perte de l'activité ocytotique de cette hormone, cette inactivation étant réversible. DICKER et GREENBAUM [120] aboutissent à des résultats identiques en ce qui concerne l'activité antidiurétique de la vasopressine.

L'ensemble de ces expériences montre que la longueur de la chaîne est très importante pour l'activité biologique de ces peptides et aucune modification ne semble possible.

En résumé, d'après l'examen de tous ces analogues, on ne possède que très peu de degrés de liberté lorsqu'on veut modifier une structure en conservant les activités biologiques. Certains analogues peuvent à la rigueur jouer le même rôle que les hormones naturelles, mais ces dernières possèdent les arrangements les mieux adaptés à leur fonction et restent ainsi les plus efficaces.

CONCLUSIONS

Les hormones neurohypophysaires et l'évolution

Toute interprétation de l'évolution d'une fonction hormonale devrait tenir compte du fait qu'une telle fonction comporte par définition deux éléments : une hormone, le « messenger chimique », synthétisée par une glande endocrine, d'une part, un organe ou un tissu récepteur spécifiquement sensible, distinct de la glande endocrine, d'autre part. On conçoit qu'agent et récepteur soient adaptés l'un à l'autre et le chapitre précédent a montré que les hormones naturelles étaient beaucoup plus efficaces que tous les analogues synthétiques réalisés jusqu'à ce jour. Néanmoins, cette adaptation n'implique pas que le mécanisme biochimique de synthèse de l'agent soit nécessairement lié ou dépendant des mécanismes biochimiques assurant la formation de la cellule réceptrice. Autrement dit, les variations que subit la structure de l'hormone ne sont pas obligatoirement synchronisées avec des variations correspondantes du récepteur. La fonction hormonale peut donc évoluer soit par une modification du récepteur, soit par une modification de l'agent et, en fait, il s'agit d'une double évolution.

Ce travail ayant été limité à l'étude des hormones elles-mêmes, nous n'envisagerons que l'évolution éventuelle des molécules actives dans le cadre plus général des variations des protéines d'une espèce à l'autre. Il faut d'abord remarquer que nos recherches concernent une dizaine d'espèces appartenant à quatre classes de vertébrés, et que cet échantillon paraît bien faible en regard des quelque 50.000 espèces connues. Cependant, sans vouloir minimiser la diversité possible des hormones neurohypophysaires, on ne peut nier qu'il y ait une grande stabilité des structures, dans certaines classes tout au moins. Chez les mammifères par exemple, les résultats obtenus au cours de ces investigations sur le cheval, le mouton et la baleine viennent s'ajouter à ceux acquis antérieurement en ce qui concerne

l'homme, le bœuf et le porc. Chez ces six espèces appartenant à des genres différents et ayant des conditions de vie et des habitudes alimentaires différentes, on trouve la même ocytocine. D'autre part, chez la poule, la grenouille et trois espèces de poissons osseux marins, on trouve la même vasotocine.

Lorsqu'on examine l'ensemble des hormones neurohypophysaires actuellement connues chez les vertébrés, on est conduit à admettre les conclusions suivantes :

- 1 — Chez toutes les espèces étudiées existent deux hormones dominantes et, dans tous les cas où l'étude de la structure a été réalisée, ces deux hormones se sont révélées chimiquement parentes (la deuxième hormone des poissons osseux marins, l'isotocine, a été isolée et caractérisée dans ce laboratoire).
- 2 — Ces hormones sont construites selon un motif moléculaire commun caractérisé par un enchaînement de 9 résidus d'acides aminés avec un pont disulfure 1-6.
- 3 — Dans une classe donnée, on observe une grande stabilité des structures et, d'une classe à l'autre, les variations affectent 1 ou au maximum 2 résidus sur 9.
- 4 — Les changements ou « mutations » paraissent affecter des positions privilégiées de la chaîne, à savoir les positions n° 3 et n° 8.

Cette dernière observation est à rapprocher d'observations semblables concernant par exemple les insulines de différentes espèces de mammifères chez lesquelles on note des variations uniquement dans les positions n°s 8, 9 et 10 de la chaîne A, alors que les 48 autres positions ne sont pas modifiées. S'agit-il de changements privilégiés se manifestant au cours de la biosynthèse ou bien tout simplement de changements tolérés, les variations dans les autres points de la chaîne faisant disparaître les activités biologiques, et entraînant l'élimination de la molécule par le jeu de la sélection naturelle ? On ne peut répondre à cette importante question.

La dualité observée chez les hormones neurohypophysaires (ocytocine et vasopressine chez les mammifères, isotocine et vasotocine chez les poissons) se révèle de plus en plus dans le domaine des protéines : chaînes α et β de l'hémoglobine, chymotrypsinogène A et B du pancréas, β -lactoglobuline A et B du lait de vache, etc. Chimiquement, il s'agit de protéines très proches, paraissant presque décalquées l'une de l'autre avec quelques substitutions ou variations. Cette dualité a naturellement fait penser à un phénomène de dupli-

cation. On admet généralement que la biosynthèse de chaque peptide ou protéine est contrôlée par un gène. La duplication du gène entraînera celle du peptide ou de la protéine, mais ce qui distinguera les deux molécules, jumelles à l'origine, c'est qu'elles dépendront chacune d'un gène autonome et qu'elles pourront subir chacune des mutations indépendantes dues aux mutations du gène de contrôle. Dans le cas des hémoglobines, on a observé chez la lamproie, espèce de la classe très primitive des cyclostomes, une seule molécule ayant sensiblement la taille de la chaîne α ou de la chaîne β que l'on trouve simultanément chez les autres vertébrés ; l'hypothèse du dédoublement paraît trouver ici une base expérimentale. Une tentative de caractérisation de l'hormone ou des hormones neurohypophysaires de la lamproie a été faite, mais les quantités de matériel disponible se sont révélées trop faibles pour permettre une conclusion. Néanmoins, il semble que l'une des hormones (vasotocine chez le poulet et la grenouille, vasopressine chez les mammifères) interviendrait dans la régulation du métabolisme hydro-minéral alors que l'autre agirait plutôt dans le domaine des fonctions de reproduction. Cette distinction physiologique permettrait de distinguer deux lignées de molécules des poissons aux mammifères, l'une allant de l'isotocine à l'ocytocine, l'autre de la vasotocine à la vasopressine. De nouvelles recherches seront nécessaires pour isoler des « maillons » peut-être nouveaux chez les batraciens, les reptiles et les poissons cartilagineux. Notre propre contribution se limite à l'isolement et l'analyse de l'ocytocine et de la vasopressine de trois espèces de mammifères, et la caractérisation chimique de la vasotocine du poulet, de la grenouille et de trois espèces de poissons osseux marins.

RESUME

Les hormones neurohypophysaires des vertébrés sont des polypeptides courts dont l'étude de la structure est relativement aisée, et ce travail a été entrepris dans le but de mettre en évidence les variations que subissent les hormones d'une espèce à l'autre et éventuellement de trouver dans ce domaine une base chimique de l'évolution.

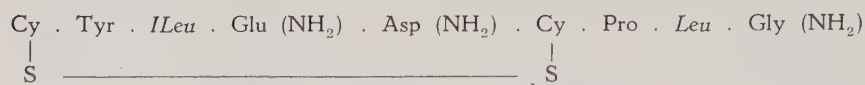
La purification des hormones est considérablement facilitée par le fait que les activités biologiques qu'elles manifestent (activité ocytotique, activité vasopressique, activité hydroosmotique) peuvent être dosées avec précision et qu'il est possible de contrôler l'efficacité des procédés de fractionnement ainsi que leur rendement. Nous avons mis en œuvre une technique particulière d'adsorption spécifique des peptides actifs sur une protéine-support. Dans une première étape, le complexe hormones-protéine est précipité à partir des extraits de post-hypophyse au moyen de chlorure de sodium à pH 3,9-4,0. Dans une deuxième étape, le complexe est dissocié et la protéine-support est éliminée par précipitation au moyen d'acide trichloracétique à 5 %. Dans une troisième et dernière étape, les hormones libérées sont purifiées par chromatographie sur un échangeur d'ions, l'Amberlite IRC-50. La méthode a permis dans tous les cas d'obtenir des produits purs.

L'isolement des principes actifs a été entrepris chez trois espèces de mammifères : le cheval, le mouton et la baleine, une espèce d'oiseaux, la poule, une espèce de batraciens : la grenouille et trois espèces de poissons osseux : le tacaud, le lieu noir et le merlu. Chez les mammifères, deux hormones ont été isolées : l'une, l'*ocytocine*, possédant principalement l'activité ocytotique, l'autre : la *vasopressine*, possédant principalement l'activité vasopressique. Chez les vertébrés inférieurs, deux hormones ont été également mises en évidence chez toutes les espèces; l'une d'elles, la *vasotocine*, possédant à la fois les deux activités ocytotique et vasopressique, a été caractérisée.

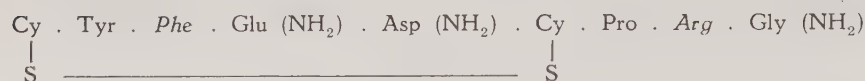
Toutes les substances isolées ont été soumises à l'analyse quantitative en acides aminés. Les structures ont été déterminées en faisant appel à des techniques chimiques et enzymatiques. Chez le cheval, le mouton et la baleine, ont été trouvées une ocytocine et une vasopressine identiques à

celles antérieurement isolées de la post-hypophyse du bœuf. Il apparaît ainsi que ces hormones varient peu d'une espèce à l'autre dans cette classe. La vasotocine, isolée chez le poulet, la grenouille et les poissons osseux, se présente comme un « hybride » moléculaire de l'ocytocine et de la vasopressine comme le montre la comparaison des formules :

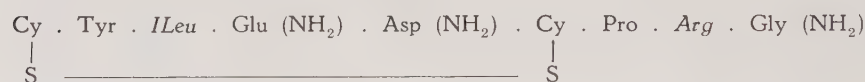
— *Ocytocine* :



— *Vasopressine* :



— *Vasotocine* :



Les relations existant entre la structure et les activités biologiques ont été discutées à la lumière des propriétés des hormones naturelles et de celles des analogues synthétiques actuellement connues.

Au point de vue de l'évolution, on a trouvé chez plusieurs espèces deux hormones chimiquement très voisines et ceci suggère l'existence de deux lignées de molécules dérivant les unes des autres par substitution d'un ou deux résidus d'acides aminés.

BIBLIOGRAPHIE

1. DALE (H.) et LAIDLAW (P.P.). — *J. Pharmacol. a. Exper. Ther.*, 4 (1912), 75.
2. BURN (J.H.) et DALE (H.H.). — *Med. Res. Counc. Spec. Rep. Ser.*, n° 69 (1922).
3. HOLTON (P.). — *Brit. J. Pharmacol.*, 3 (1948), 328.
4. MUNSICK (R.A.). — *Endocrinology*, 66 (1960), 451.
5. BERDE (B.) et CERLETTI (A.). — *Acta Endocrinol.*, 27 (1958), 314.
6. ROWE (L.W.). — *Endocrinology*, 13 (1929), 205.
7. HOGBEN (L.T.), SCHLAPP (W.) et MAC DONALD (A.D.). — *Quart. J. Exper. Physiol.*, 14 (1924), 301.
8. LANDGREBE (F.W.), MACAULAY (M.H.F.) et WARING (H.). — *Proc. Roy. Soc. Edinburgh, Sect. B.*, 62 (1946), 202.
9. LINDQUIST (K.M.) et ROWE (L.W.). — *Drug Standards*, 23 (1955), 153.
10. DEKANSKY (J.). — *Brit. J. Pharmacol.*, 7 (1952), 567.
11. PETERSEN (W.E.). — *Physiologic Rev.*, 24 (1944), 340.
12. BRAUDE (R.) et MITCHELL (K.G.). — *Nature*, 165 (1950), 937.
13. WHITTLESTONE (W.G.). — *J. of Endocrin.*, 8 (1952), 89.
14. CROSS (B.A.) et VAN DYKE (H.B.). — *J. of Endocrin.*, 9 (1953), 232.
15. CROSS (B.A.) et HARRIS (G.W.). — *J. of Endocrin.*, 8 (1952), 148.
16. THORN (N.A.). — *Physiologic Rev.*, 38 (1958), 169.
17. VAN DYKE (H.B.), ADAMSON (K.J.R.) et ENGEL (S.L.). — *Recent Progress in Hormone Research*, 11 (1955), 1.
18. BURN (J.H.). — *Quart. J. Pharmacy*, 4 (1931), 517.
19. JEFFERS (W.A.), LIVEZEY (M.M.) et AUSTIN (J.H.). — *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, 50 (1942), 184.
20. DICKER (S.E.). — *J. Physiol.*, 122 (1953), 149.

21. SAWYER (W.H.). — *Endocrinology*, 63 (1958), 694.
22. MOREL (F.). — *Bull. Biol.* (1955), suppl. 39.
23. LINDQUIST (K.M.) et ROWE (L.W.). — *J. Amer. Pharmaceut. Assoc.*, 38 (1949), 227.
24. HELLER (H.) et BLACKMORE (K.E.). — *J. of Endocrin.*, 8 (1952), 224.
25. PATON (D.N.) et WATSON (A.). — *J. of Physiol.*, 44 (1912), 413.
26. COON (J.M.). — *Arch. Internat. Pharmacodynamie*, 62 (1939), 79.
27. HELLER (H.) et PICKERING (B.T.). — *J. Physiol.*, 155 (1961), 98.
28. MUNSICK (R.A.), SAWYER (W.H.) et VAN DYKE (H.B.). — *Endocrinology*, 66 (1960), 860.
29. USSING (H.H.). — *Symposium n° 8 of the Soc. for Exptl. Biol.* (1954), 407.
30. MAETZ (J.), MOREL (F.) et RACE (B.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 36 (1959), 317.
31. LEAF (A.) et RENSHAW (A.). — *Biochem. J.*, 65 (1957), 82.
32. BRUNN (B.). — *Zschr. Gesamt. Exp. Med.*, 25 (1921), 170.
33. BOYD (E.M.) et MACH (E.G.). — *Endocrinology*, 26 (1940), 153.
34. HELLER (H.). — *J. Physiol.*, 100 (1941), 125.
35. SAWYER (W.H.) et SCHISGALL (R.M.). — *Amer. J. Physiol.*, 187 (1956), 312.
36. BENTLEY (P.J.). — *J. of Endocrin.*, 16 (1957), 126.
37. BENTLEY (P.J.). — *J. of Endocrin.*, 17 (1958), 201.
38. RASMUSSEN (H.), SCHWARTZ (M.A.), CHOESSLER (S.) et HOCHSTER (G.). — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 46 (1960), 1278.
39. SAWYER (W.H.). — *Endocrinology*, 66 (1960), 112.
40. SAWYER (W.H.). — *Amer. J. Physiol.*, 189 (1957), 564.
41. URANGA (J.) et SAWYER (W.H.). — *Amer. J. Physiol.*, 198 (1960), 1287.
42. JARD (S.), MAETZ (J.) et MOREL (F.). — *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 251 (1960), 788.
43. WILHELMI (A.E.), PICKFORD (G.E.) et SAWYER (W.H.). — *Endocrinology*, 57 (1955), 243.
44. The Pharmacopeia of the United States of America Sixteenth Revision (1960), 793.
45. KUMAGAI (H.), EBASHI (S.) et TAKODA (F.). — *Jap. J. Pharmacol.*, 65 (1952), 81.

46. JALON (G. DE). — *Farmacoterap. Actual.*, 4 (1947), 177.
47. TURNER (R.A.), PIERCE (J.G.) et VIGNEAUD (V. DU). — *J. Biol. Chem.*, 191 (1951), 21.
48. PIERCE (J.G.) et VIGNEAUD (V. DU). — *J. Biol. Chem.*, 186 (1950), 77.
49. MAIER-HUSER (H.), CLAUSER (H.), FROMAGEOT (P.) et PLONGERON (R.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953), 252.
50. FROMAGEOT (P.), ACHER (R.), CLAUSER (H.) et MAIER-HUSER (H.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953), 424.
51. WARD (O.N.) et GUILLEMIN (R.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. a. Med.*, 96 (1957), 568.
52. SCHALLY (A.V.), LIPSCOMB (H.S.) et GUILLEMIN (R.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 31 (1959), 252.
53. PORATH (J.). — *Arkiv. Kemi.*, 11 (1957), 259.
54. ACHER (R.), LIGHT (A.) et VIGNEAUD (V. DU). — *J. Biol. Chem.*, 233 (1958), 116.
55. VAN DYKE (H.B.), CHOW (B.F.), GREEP (R.O.) et ROTHEN (A.). — *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 74 (1942), 190.
56. ACHER (R.), CHAUVET (J.) et OLIVRY (G.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956), 421.
57. WINNICK (T.), WINNICK (R.E.), ACHER (R.) et FROMAGEOT (C.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955), 488.
58. LIGHT (A.), ACHER (R.) et VIGNEAUD (V. DU). — *J. Biol. Chem.*, 228 (1957), 633.
59. KUNKEL (H.G.), TAYLOR (S.P. Jr) et VIGNEAUD (V. DU). — *J. Biol. Chem.*, 200 (1953), 559.
60. HIRS (C.H.W.), MOORE (S.) et STEIN (W.H.). — *J. Biol. Chem.*, 200 (1953), 493.
61. LOWRY (O.H.), ROSEBROUGH (N.J.), FARR (A.L.) et RANDALL (R.J.). — *J. Biol. Chem.*, 193 (1951), 265.
62. ACHER (R.) et CROCKER (C.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952), 704.
63. GEILING (E.M.K.). — *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 57 (1935), 123.
64. VALSO (J.). — *Biochemical Studies of Whaling Problems*, 16 (1938), 18.
65. VIGNEAUD (V. DU), RESSLER (C.) et TRIPPETT (S.). — *J. Biol. Chem.*, 205 (1953), 949.
66. TUPPY (H.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953), 449.

67. ACHER (R.) et CHAUVET (J.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954), 421.
68. VIGNEAUD (V. DU), LAWLER (H.C.) et POPENOE (E.A.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953), 4880.
69. LIGHT (A.) et VIGNEAUD (V. DU). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. a. Med.*, 98 (1958), 692.
70. POPENOE (E.A.), LAWLER (H.C.) et VIGNEAUD (V. DU). — *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952), 3713.
71. PIERCE (J.G.), GORDON (S.) et VIGNEAUD (V. DU). — *J. Biol. Chem.*, 199 (1952), 929.
72. WARD (D.W.) et VIGNEAUD (V. DU). — *J. Biol. Chem.*, 222 (1956), 951.
73. KATSOYANNIS (P.G.) et VIGNEAUD (V. DU). — *J. Biol. Chem.*, 233 (1958), 1352.
74. PICKERING (B.T.) et HELLER (H.). — *Nature*, 184 (1959), 1463.
75. SAWYER (W.H.), MUNSICK (R.A.) et VAN DYKE (H.B.). — *Nature*, 184 (1959), 1464.
76. MAETZ (J.), MOREL (F.) et LAHLOUH (B.). — *Nature*, 184 (1959), 236.
77. VAN DYKE (H.B.), ENGEL (S.L.) et ADAMSONS (K.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. a. Med.*, 91 (1956), 484.
78. HELLER (H.) et LEDERIS (K.). — *J. Physiol.*, 151 (1960), 47.
79. SAWYER (W.H.), MUNSICK (R.A.) et VAN DYKE (H.B.). — *Endocrinology*, 67 (1960), 137.
80. SAWYER (W.H.), MUNSICK (R.A.) et VAN DYKE (H.B.). — *Endocrinology*, 68 (1961), 215.
81. SAWYER (W.H.). — *Pharmacological Reviews*, 13 (1961), 225.
82. POLSON (A.), MOSLEY (V.M.) et WYCKOFF (R.W.G.). — *Science*, 105 (1947), 603.
83. BRAND (E.) et EDSALL (J.T.). — *Ann. Rev. Biochem.*, 16 (1947), 224.
84. SPACKMAN (D.H.), STEIN (W.H.) et MOORE (S.). — *Anal. Chem.*, 30 (1958), 1190.
85. HIRS (C.H.W.). — *J. Biol. Chem.*, 219 (1956), 611.
86. SANGER (F.). — *Biochem. J.*, 39 (1945), 507.
87. FRAENKEL-CONRAT (H.), HARRIS (J.I.) et LEVY (A.L.). — *Methods of Biochemical Analysis* (Edited by D. Glick), vol. II (1955), 359.
88. EDMAN (P.). — *Acta Chem. Scand.*, 4 (1950), 277.

89. TOENNIES (G.) et KOLB (J.J.). — *Anal. Chem.*, 23 (1951), 823.
90. GUNTELBERG (A.V.) et OTTESEN (M.). — *Nature*, 170 (1952), 802.
91. SANGER (F.). — *Advances Protein. Chem.*, 7 (1952), 1.
92. GORDON (A.H.), MARTIN (A.J.P.) et SYNGE (R.L.M.). — *Biochem. J.*, 35 (1941), 1369.
93. ACHER (R.). — *Ann. Rev. Biochem.*, 29 (1960), 547.
94. CHINARD (F.P.). — *J. Biol. Chem.*, 199 (1952), 91.
95. FRAENKEL-CONRAT (H.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954), 3606.
96. SANGER (F.) et TUPPY (H.). — *Biochem. J.*, 49 (1951), 463.
97. ACHER (R.), JUTISZ (M.) et FROMAGEOT (C.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950), 81.
98. HILL (R.L.) et SMITH (E.L.). — *J. Biol. Chem.*, 228 (1957), 577.
99. HILL (R.L.) et SMITH (E.L.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 31 (1959), 257.
100. HUGUENIN (R.L.) et BOISSONNAS (R.A.). — *Helv. Chim. Acta*, 45 (1962), 1629.
101. MOREL (F.), MAETZ (J.), ACHER (R.), CHAUVET (J.) et LENCI (M.T.). — *Nature*, 190 (1961), 829.
102. SAWYER (W.H.). — *Recent Progress in Hormon Research*, 17 (1961), 437.
103. RASMUSSEN (H.) et CRAIG (L.). — *Endocrinology*, 68 (1961), 1051.
104. PERKS (A.M.), DODD (M.H.I.) et DODD (J.M.). — *Nature*, 185 (1960), 850.
105. CASH (W.D.), CULLOCH MAHAFFEY (L. Mc), BUCK (A.S.), NETTLETON (D.E.), ROMAS (J.R.C.) et VIGNEAUD (V. du). — *J. of Med. Pharm. Chem.*, 5 (1962), 413.
106. MEIENHOFER (J.) et VIGNEAUD (V. du). — *J. Am. Chem. Soc.*, 83 (1961), 142.
107. BOISSONNAS (R.A.), GUTTMAN (S.T.), BERDE (B.) et KONZETT (H.). — *Experientia*, 17 (1961), 377.
108. RESSLER (C.) et VIGNEAUD (V. du). — *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957), 4511.
109. JAQUENOLID (P.A.) et BOISSONNAS (R.A.). — *Helv. Chim. Acta*, 45 (1962), 1601.
110. LUTZ (W.B.), RESSLER (C.), NETTLETON (D.E.) et VIGNEAUD (V. du). — *J. Am. Chem. Soc.*, 81 (1959), 167.
111. BOISSONNAS (R.A.) et HUGUENIN (R.L.). — *Helv. Chim. Acta*, 43 (1960), 182.
112. KIMBROUGH (R.D. Jr) et VIGNEAUD (V. du). — *J. Biol. Chem.*, 236 (1961), 778.

113. KATSOYANNIS (P.G.) et VIGNEAUD (V. DU). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 78 (1958), 555.
 114. HOPE (D.B.), MURTI (V.V.S.) et VIGNEAUD (V. DU). — *J. Biol. Chem.*, 237 (1962), 1563.
 115. JAQUENOUD (P.A.) et BOISSONNAS (R.A.). — *Helv. Chim. Acta*, 45 (1962), 1462.
 116. RESSLER (C.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 92 (1956), 725.
 117. VIGNEAUD (V. DU), FITT (P.S.), BODANSZKY et O'CONNELL (M.). — *Soc. Exp. Biol. a. Med.*, 104 (1960), 653.
 118. JARVIS (D.), BODANSZKY (M.) et VIGNEAUD (V. DU). — *J. Amer. Chem. Soc.*, 83 (1961), 4780.
 119. AUDRAIN (L.) et CLAUSER (H.). — *Biochim. et Biophys. Acta*, 30 (1958), 191.
 120. DICKER (S.E.) et GREENBAUM (A.L.). — *J. Physiol.*, 141 (1958), 107.
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
----------------------	---

Première partie

TECHNIQUES PHYSIOLOGIQUES

<i>Chapitre I.</i> — Propriétés biologiques des extraits posthypophysaires dans les différentes classes de vertébrés	5
A) <i>Activités biologiques chez les mammifères</i>	5
B) <i>Activités biologiques chez les oiseaux</i>	9
C) <i>Activités biologiques chez les batraciens</i>	10
D) <i>Activités biologiques chez les poissons</i>	13
<i>Chapitre II.</i> — Dosages biologiques utilisés	14
A) <i>Dosage de l'activité ocytocique</i>	14
B) <i>Dosage de l'activité vasopressique</i>	15
C) <i>Dosage de l'activité hydro-osmotique</i>	16

Deuxième partie

ISOLEMENT DES HORMONES NEUROHYPOPHYSAIRES DES MAMMIFERES, DES OISEAUX, DES BATRACIENS ET DES POISSONS

<i>Chapitre I.</i> — Isolement des hormones des mammifères	23
A) <i>Isolement des hormones du cheval</i>	23
B) <i>Isolement des hormones du mouton</i>	33
C) <i>Isolement des hormones de la baleine à nageoire</i>	40
<i>Chapitre II.</i> — Isolement des hormones des oiseaux	47
— <i>Isolement des hormones du poulet</i>	47
<i>Chapitre III.</i> — Isolement des hormones des batraciens	54
— <i>Isolement des hormones de grenouille</i>	54
<i>Chapitre IV.</i> — Isolement des hormones des poissons osseux marins : Tacaud, Lieu noir, Merlu, Cabillaud	61

Troisième partie

STRUCTURE DES HORMONES NEUROHYPOPHYSAIRES
CARACTERISATION DE LA VASOTOCINE

<i>Chapitre I. — Structure des ocytocines du cheval, du mouton et de la baleine</i>	
à nageoire	73
A) Critères de pureté	73
B) Composition en acides aminés	76
C) Structure	78
<i>Chapitre II. — Structure des vasopressines du cheval, du mouton et de la baleine</i>	
.. .. .	87
A) Critères de pureté	87
B) Composition en acides aminés	89
C) Structure	92
<i>Chapitre III. — Caractérisation de la vasotocine des vertébrés inférieurs</i>	97
A) Structure de la vasotocine	97
B) Propriétés biologiques de la vasotocine	103

Quatrième partie

RELATIONS ENTRE LA STRUCTURE
ET LES ACTIVITES BIOLOGIQUES

Adaptation de la structure aux activités biologiques chez les mammifères ..	111
CONCLUSIONS	119
RESUME	123
BIBLIOGRAPHIE	125

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

**Chimie et génétique
de la
tryptophane-synthétase de Eschérichia Coli**

Vu et approuvé :

Paris, le 3 mars 1964

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

MARC ZAMANSKY

Vu et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

JEAN ROCHE

I M P R I M E R I E
R. FOULON & Cie
29, Rue Deparcieux, 29
P A R I S (XIV^e)
